

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Karolina Majerová

Komáří flaviviry v České republice
Mosquito flaviviruses in the Czech Republic

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.
Školitel specialista: Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. 8. 2016

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své rodině a svým nejbližším za podporu během celého studia. Děkuji také Mgr. Patrikovi Kilianovi a Mgr. Janě Rádrové, PhD. za to, že mě naučili mnoho laboratorních metod a pomohli mi zorientovat se v prostředí laboratoře. Pořadatelům i účastníkům akce *Acrocephalus* děkuji za umožnění odchytů komárů v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně a za příjemnou spolupráci, díky které jsem se mezi nimi cítila jako doma. Mgr. Magdě Jančářové a Mgr. Janě Rádrové, PhD. děkuji za pečlivé pročtení této práce a za cenné rady nejen ohledně samotného sepisování, ale také během mé práce v laboratoři.

Největší poděkování pak patří mým školitelům, Doc. RNDr. Janu Votýpkovi, PhD. a Doc. RNDr. Danielovi Růžkovi, PhD. Děkuji vám, že jsem měla možnost pod vaším vedením pracovat na tak zajímavém tématu, jehož zpracování mě bavilo a naplňovalo. Děkuji vám za vaše konzultace, užitečné rady a pomoc při řešení vzniklých problémů a především za důvěru, kterou jste ve mě vložili, když jste s vedením mé práce souhlasili. Věřím, že jsem vaši důvěru nezklamala.

ABSTRAKT

Flaviviry (rod *Flavivirus*, čeleď *Flaviviridae*) zahrnují mnoho medicínsky i veterinárně významných arbovirů. Většina z nich je přenášena komáry, jako např. virus západonilské horečky, virus žluté zimnice, virus dengue nebo virus zika. Během posledního desetiletí však bylo objeveno mnoho flavivirů bez prokázaného obratlovčího hostitele, které jsou označovány jako specificky hmyzí flaviviry (ISFs).

Tyto viry byly detekovány u dvoukřídlého hmyzu (v naprosté většině případů u komárů) z celého světa. Zdá se, že ani u hmyzu nezpůsobují patologické změny a nejsou schopné infikovat žádné obratlovčí buňky. Několik nedávných studií však prokázalo schopnost některých ISFs ovlivnit replikaci medicínsky významných flavivirů v komářích buňkách. Specificky hmyzí flaviviry navíc pravděpodobně představují evolučně původní linii čeledi *Flaviviridae*, a jejich studium by proto mohlo pomoci objasnit, které vlastnosti flavivirům umožnily infikovat obratlovce. O ekologii ISFs není známo mnoho informací a předpokládá se, že většina zástupců dosud nebyla objevena.

Hlavním cílem této práce bylo detekovat ISFs u komárů v České republice, kde zatím neproběhl žádný rozsáhlejší výzkum cílený na tyto viry. V případě objevu nepopsaných ISFs jsme chtěli stanovit jejich fylogenetickou pozici a pokusit se o jejich izolaci na buněčné kultuře.

Klíčová slova: specificky hmyzí flaviviry, komáři, Česká republika

ABSTRACT

Flaviviruses (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) includes a number of medically and veterinary important arboviruses. Most of them are transmitted by mosquitoes, such as West Nile virus, yellow fever virus, dengue virus or Zika virus. In the last decade, there has been discovered number of flaviviruses which have not known vertebrate host. They are called insect-specific flaviviruses (ISFs).

These viruses have been detected in dipteran insects (mostly in mosquitoes) from all over the world. It seems they induce no pathogenic changes even in insect and they are not able to infect any vertebrate cells. However in some recent studies has been shown that some ISFs could influence the replication of other medically important flaviviruses in mosquito cells. In addition, they probably represent an ancestral lineage of the family *Flaviviridae* and further studies focused on them could help to clarify which characteristics of flaviviruses enable them to infect vertebrates. There is not a lot of information about the ecology of ISFs and it is suggested that most ISFs have not been discovered yet.

Main goal of this thesis was to detect of ISFs in mosquitoes in the Czech Republic, where have not been made any extensive research of these viruses yet. In case of discover some undescribed ISFs we wanted to characterize their phylogenetic position and try to isolate them on the cell culture.

Keywords: insect-specific flaviviruses, mosquitoes, the Czech Republic

Obsah

Seznam zkratk použitých v diplomové práci

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1 Obecná charakteristika flavivirů specifických pro hmyz (ISFs).....	2
2.2 Historie objevů, geografická distribuce a hostitelská specifita ISFs.....	4
2.3 Fylogeneze a evoluce ISFs.....	9
2.3.1 Klasické flaviviry specifické pro hmyz.....	10
2.3.2 Flaviviry specifické pro hmyz příbuzné dvouhostitelským flavivirům.....	12
2.4 Integrace ISFs do genomu hostitelů a jejich DNA v buněčných kulturách.....	13
2.5 Experimentální infekce komářích buněk	18
2.6 Experimentální infekce obratlovčích buněk.....	20
2.7 Experimentální infekce komárů.....	21
2.8 Koinfekce ISFs a MBFs.....	23
2.8.1 Pokusy <i>in vitro</i>	24
2.8.2 Pokusy <i>in vivo</i>	26
2.9 Vertikální a horizontální přenos ISFs.....	28
2.9.1 Vertikální přenos.....	28
2.9.2 Horizontální přenos.....	29
3 MATERIÁL A METODIKA.....	31
3.1 Odchyt a druhová determinace komárů.....	31
3.1.1 Odchyt komárů.....	31
3.1.2 Druhová determinace odchycených komárů.....	34
3.1.3 Izolace DNA a specifická amplifikace pro rozlišení druhů <i>Cx. pipiens</i> a <i>Cx. torrentium</i>	35
3.2 Detekce flavivirové RNA.....	37
3.2.1 Izolace RNA.....	37
3.2.2 Přečištění DNázou.....	37
3.2.3 Přepis RNA do cDNA.....	38
3.2.4 Specifická polymerázová řetězová reakce (PCR).....	39
3.2.5 Elektroforéza, izolace DNA z PCR produktů a sekvenační reakce.....	42
3.2.6 Vyhodnocení sekvencí a fylogenetické analýzy.....	43

3.3	Izolace virů na komářích buněčných kulturách C6/36.....	44
3.3.1	Příprava buněk.....	45
3.3.2	Příprava vzorku.....	45
3.3.3	Postup při infekci buněčné kultury.....	45
3.3.4	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	46
3.4	Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu.....	46
3.4.1	Laboratorní chov komárů <i>Culex quinquefasciatus</i>	46
3.4.2	Experimentální infekce.....	47
3.4.2.1	Infekce cukernou potravou.....	47
3.4.2.2	Infekce sáním krve.....	47
3.4.2.3	Infekce larev.....	48
3.4.2.4	Intrathorakální injekce.....	48
4	VÝSLEDKY.....	49
4.1	Odchyt komárů.....	49
4.1.1	Druhové složení a porovnání početnosti odchycených komárů.....	50
4.1.2	Zastoupení druhů <i>Cx. pipiens</i> a <i>Cx. torrentium</i> v rámci komplexu <i>Cx. pipiens</i> ...52	
4.2	Detekce flavivirové RNA.....	53
4.2.1	Detekce ISFs u odchycených komárů.....	53
4.2.2	Vyhodnocení detekovaných flavivirových sekvencí.....	54
4.3	Experimentální infekce.....	58
4.3.1	Izolace virů na komářích buněčných kulturách C6/36.....	58
4.3.2	Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu.....	61
5	DISKUSE.....	62
5.1	Odchyt komárů	62
5.2	Detekce flavivirů.....	64
5.2.1	Vyhodnocení detekovaných flavivirových sekvencí.....	64
5.3	Experimentální infekce.....	67
5.3.1	Izolace virů na buněčných kullturách C6/36.....	67
5.3.2	Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu.....	68
6	ZÁVĚR.....	70
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	71

Seznam zkratk použitých v diplomové práci:

AeFV – Aedes flavivirus

AeVeFV – Aedes vexans flavivirus

bp – jednotka páry bází

CDC pasti – odchytné pasti z Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (Center for Disease Control and Prevention), John W. Hock, USA

cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)

CFAV – Cell fusing agent virus

cISFs – klasické flaviviry specifické pro hmyz (classical insect specific flaviviruses)

CPE – cytopatický efekt

CSA – Cell silent agent

CxFV – Culex flavivirus

dISFs – flaviviry specifické pro hmyz příbuzné dvouhostitelským flavivirům (dual-host affiliated insect specific flaviviruses)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNáza – deoxyribonukleáza; hydrolytický enzym, který je schopen štěpit molekuly deoxyribonukleové kyseliny

dsDNA – dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)

EVEs – virové sekvence, které se integrovaly do genomu hostitele (endogenous viral elements)

FBS – fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)

HANKV – Hanko virus

CHAOV – Chaoyang virus

ISF – flavivirus specifický pro hmyz

ISFs – flaviviry specifické pro hmyz

ISVs – viry specifické pro hmyz

JEV – virus Japonské encefalitidy (Japanese encephalitis virus)

KRV – Kamiti River virus

LAMV – Lammi virus

MBFs – flaviviry přenášené komáry na obratlovce (Mosquito borne flaviviruses)

ML – maximální věrohodnost (Maximum Likelihood)

NHUV – Nhumirim virus

NOUV – Nounané virus

NPR – Národní přírodní rezervace

NS – nestrukturní protein

PBS – fosfátový pufr s NaCl (phosphate buffered saline)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PCV – Palm Creek virus

p. i. – po infekci

PřF UK – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

RNA – ribonukleová kyselina

RNáza – ribonukleáza, hydrolytický enzym, který je schopen štěpit řetězce ribonukleové kyseliny

RPM – otáčky za minutu (revolutions per minute)

SLEV – virus St. Louis encefalitidy (St. Louis encephalitis virus)

TOT – transovariální přenos (transovarial transmission)

UV – ultrafialové

WNV – virus západonilské horečky (West Nile virus)

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Viry přenášené členovci (tzv. arboviry) působí mnoho závažných onemocnění lidí i zvířat. Významnou skupinou v rámci arbovirů jsou flaviviry (*Flaviviridae*, rod *Flavivirus*), z nichž mnoho druhů přenáší na obratlovce komáři. K celosvětově nejdůležitějším patogenním flavivirům přenášeným komáři patří například virus žluté zimnice, virus horečky dengue či virus západonilské horečky.

V roce 1974 byl z komářích buněk izolován první flavivirus, u kterého nebyla prokázána schopnost infikovat buňky obratlovců. Další jemu příbuzný virus byl objeven až o více než dvacet let později. Pro tyto viry fylogeneticky vzdálené od flavivirů přenosných na obratlovce se zavedl název „insect specific flaviviruses“ (ISFs), tedy specificky hmyzí flaviviry. Díky průzkumům, které byly zaměřeny na sledování výskytu medicínsky významných flavivirů v populacích komárů z různých částí světa, se počet nově popsanych druhů ISFs rok od roku rapidně zvyšoval a předpokládá se, že většina ISFs na své objevení teprve čeká.

Zájem o výzkum specificky hmyzích flavivirů nebyl zpočátku veliký, neboť se zdálo, že nemají z lékařského ani veterinárního hlediska žádný význam. Některé pokusy z posledních let však prokázaly jejich schopnost zvýšit či naopak potlačit replikaci jiných flavivirů v komářích buňkách. Vzhledem k celosvětovému rozšíření ISFs v širokém spektru hostitelských druhů komárů by jejich případný vliv na snížení schopnosti replikace medicínsky významných flavivirů mohl nabídnout nové metody prevence přenosu původců život ohrožujících chorob. Vzhledem k tomu, že specificky hmyzí flaviviry nepůsobí v tělech komárů žádné patologické změny, jednalo by se o způsob biologické kontroly, který by neohrožoval celkové ekologické vztahy v příslušných oblastech. Důkladné prozkoumání ISFs a jejich porovnání s dvouhostitelskými flaviviry by také mohlo přinést nové poznatky o evoluci této virové čeledi a dát odpovědi na to, které vlastnosti umožňují flavivirům infikovat obratlovčí buňky. O specificky hmyzích flavivirech se uvažuje také ve spojitosti s možností jejich potencionálního vývoje v dvouhostitelské vire.

V České republice dosud neproběhl žádný rozsáhlejší výzkum cílený na výskyt specificky hmyzích flavivirů, proto jsme za cíle mé diplomové práce zvolili:

- detekci ISFs v komárech z České republiky a zjištění jejich prevalence a hostitelské specifity
- v případě nalezení dosud nepopsaných ISFs stanovit jejich fylogenetickou pozici na základě získaných sekvencí
- izolaci ISFs na komářích buňkách C6/36 a případné experimentální infekce laboratorně chovaných komárů.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Obecná charakteristika flavivirů specifických pro hmyz (ISFs)

Arboviry (arthropod-borne viruses, viry přenášené členovci) jsou významnými původci závažných onemocnění lidí i zvířat. Díky výzkumům zaměřeným na tyto přenášené patogeny a vzhledem ke stále se zlepšujícím metodám jejich detekce bylo v posledních letech objeveno velké množství virů, kterými jsou komáři (jedni z nejdůležitějších přenašečů arbovirů) přirozeně nakaženi a které, jak se z dosavadních výzkumů zdá, nemají jiného hostitele než hmyz. Jedná se tedy o specificky hmyzí viry (insect specific viruses, ISVs), které nejsou schopny infikovat obratlovce, tedy ani člověka. Dosud popsání zástupci patří do širokého spektra čeledí: *Alphaviridae*, *Birnaviridae*, *Bunyaviridae*, *Mesoniviridae*, *Nodaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Tymoviridae*, *Togaviridae* a zejména pak do čeledi *Flaviviridae* (Vasilakis *et al.*, 2013; Bolling *et al.*, 2015b). V některých případech dokonce tvoří zcela nové taxonomické jednotky, fylogeneticky odlišné od zmíněných čeledí, jako např. Negevirus (Vasilakis *et al.*, 2013). Viry specifické pro hmyz byly detekovány u různých skupin dvoukřídlého hmyzu (Diptera): u flebotomů (Psychodidae) (Moureau *et al.*, 2010, Sánchez-Seco *et al.*, 2010; Vasilakis *et al.*, 2013), pakomárovitých (Chironomidae) (Cook *et al.*, 2013) a v největší míře pak u komárů (Culicidae) (např. Bolling *et al.*, 2015b; Calzoari *et al.*, 2015). Studium ISVs, které jsou často blízce příbuzné virům přenášeným na obratlovce, může přinést nejen nové poznatky o diverzitě a evoluci jednotlivých virových čeledí, ale také o vlivu ISVs na přenos medicínsky a veterinárně významných arbovirů včetně jejich potencionálního využití pro případnou biologickou kontrolu (Bolling *et al.*, 2015b).

Nejpočetnější a také nejdůležitější skupinou virů s výskytem ISVs je čeleď *Flaviviridae* (flaviviry). Jedná se o obalené viry, jejichž genom tvoří pozitivní jednovláknová RNA (+ss RNA). Rod *Flavivirus* zahrnuje více než 70 popsáných druhů (Huang *et al.*, 2014), které mají navzájem velice podobné uspořádání genomu s jediným otevřeným čtecím rámcem (ORF).

Většina flavivirů patří mezi arboviry a mnoho z nich působí více či méně závažná onemocnění u širokého spektra obratlovčích hostitelů. Přenašeči těchto dvouhostitelských virů jsou klíšťata (např. virus klíšťové encefalitidy) a komáři (virus žluté zimnice, virus horečky dengue, virus západonilské horečky apod.). Další skupinou jsou flaviviry, které byly

doposud izolovány pouze z obratlovců (konkrétně z hlodavců a netopýrů) a pro které je používáno označení „No Known Vector Flaviviruses“. Přestože zažitý název naznačuje, že přenašeč zatím pouze nebyl objeven, je možné, že tyto flaviviry (např. Modoc virus či Rio Bravo virus) jsou opravdu specifické pouze pro obratlovce a jejich přenos v přírodě funguje bez účasti členovců (Blitvich *et* Firth, 2015). U různých druhů virů se diskutuje o vertikálním i horizontálním přenosu mezi obratlovčími hostiteli – virové částice byly u hlodavců nalezeny např. v mléčných žlázách (Fairbrother *et* Yuill, 1987) a po experimentální infekci byly rovněž po dlouhou dobu vylučovány močí (Fairbrother *et* Yuill, 1987; Adams *et al.*, 2013); u netopýrů se pak podařilo zachytit virové částice i ve slinných žlázách (Constantine *et* Woodall, 1964).

Poslední skupinou flavivirů z hlediska hostitelské specifity jsou právě viry specifické pro hmyz, které (alespoň podle dosud provedených experimentů) nejsou na rozdíl od ostatních skupin schopné infikovat obratlovčí buňky. Pro tuto relativně nově vytvořenou skupinu není ustálen jednotný název, a tak se můžeme v literatuře setkat s výrazy „mosquito only flaviviruses“ (MOFs), „insect specific flaviviruses“ (ISFs) či pouze „insect flaviviruses“ (IFs). Vzhledem k tomu, že tyto viry byly detekovány u různých zástupců dvoukřídlého hmyzu (Moureau *et al.*, 2010; Sánchez-Seco *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2013), budu v této práci používat označení ISFs.

O biologii ISFs není známo mnoho informací. Jedním z potvrzených faktů je absence sérologické zkřížené reakce s ostatními flaviviry (Calisher *et* Gould, 2003). Zdá se, že se tyto viry vyskytují pouze u hmyzu a nevyvolávají u svých hostitelů žádné patologické změny – chovají se tedy v podstatě jako komenzálové a mohou být považovány za přirozenou součást komářího mikrobiomu, která podle některých indicií může u invazivních druhů komárů představovat dokonce kompetiční výhodu (Calzoari *et al.*, 2015; Carrera *et al.*, 2015). Jak již bylo zmíněno výše, žádný z pokusů o infekci obratlovčích buněk nebyl úspěšný, a právě tato vlastnost skupinu od začátku definovala (více viz kapitola 2.6). Vzhledem k (víceméně) náhodným zachycením ISFs v rámci výzkumů zaměřených na patogenní přenášené flaviviry po celém světě je pravděpodobné, že většina zástupců této skupiny nebyla dosud popsána, a také, že se mohou vyskytovat v širším spektru hostitelů, než je dosud známo. Hostitelské specifitě se budu podrobněji věnovat v jedné ze samostatných kapitol (2.2) stejně jako přenosu ISFs v přírodě (kapitola 2.9), protože ani přirozený způsob, jakým tyto viry perzistují v populacích komárů, není uspokojivě vysvětlen. V neposlední řadě není známo, jaký vliv mají ISFs u svých hostitelů na přenos medicínsky a veterinárně významných flavivirů a jestli s těmito příbuznými viry interferují (více viz kapitola 2.8). Sekvence příbuzné RNA

popsaných ISFs byly opakovaně nalezeny také ve formě DNA, a to jak integrované v genomu komárů, tak v buněčných kulturách, do kterých byly ISFs inokulovány (více opět v příslušné kapitole 2.4).

2.2 Historie objevů, geografická distribuce a hostitelská specifická ISFs

Prvním objeveným specificky hmyzím flavivirem byl v roce 1974 Cell fusing agent virus (CFAV). Ten byl izolován z buněčné kultury původně získané z embryí komárů druhu *Aedes aegypti*. Svůj název získal kvůli tomu, že po inokulaci do kultury jiné linie komářích buněk (z komárů *Aedes albopictus*) působil fúzi buněk, a dal tak vznikat syncytiím. Při přenesení CFAV na obratlovčí buňky k fúzi buněk nedocházelo a virus se zde ani nemnožil (Stollar *et* Thomas., 1975). CFAV byl později detekován i u volně žijících komárů na ostrovech Portoriko a Culebra (Cook *et al.*, 2006), v Thajsku, kde byla zaznamenána i koinfekce s DENV (Kihara *et al.*, 2007), v Indonésii (Hoshino *et al.*, 2009) a v Mexiku (Espinoza-Gómez *et al.*, 2011). Sekvence podobné CFAV byly nalezeny také u komárů odchycených v Argentině a v Keni, ale byly příliš krátké na to, aby bylo možné s jistotou tvrdit, že se jedná o stejný virus (Ochieng *et al.*, 2013; Genbank Acc. Nos. DQ335466, DQ335467 a DQ431718; Blitvich *et* Firth, 2015). Cell fusing agent virus byl rovněž izolován z komárů z laboratorní kolonie pocházející ze Spojených států amerických (Bolling *et al.*, 2015). Historicky druhým popsáním specificky hmyzím flavivirem byl Kamiti River virus (KRV) izolovaný v roce 1999 z komárů odchycených v Keni. Jeho objev byl publikován až téměř o 30 let později než první článek o CFAV. Kamiti River virus zároveň představoval první ISF, který byl izolován z volně žijících komárů (Sang *et al.*, 2003). Sekvence blízce příbuzné KRV byly nalezeny také u komárů v Argentině, ale i v tomto případě byly příliš krátké na to, aby byl výskyt viru v této zemi potvrzen (Genbank Acc. No. DQ335465; Blitvich *et* Firth, 2015).

Během několika posledních let vyšlo mnoho článků o nově objevených specificky hmyzích flavivirech, z nichž některé jsou prokazatelně rozšířené na několika kontinentech (viz tabulka č. 1). Některé ISFs byly popsány vícekrát nezávisle na sobě pod různými názvy. Kuno *et al.* (1998) postulovali, že flaviviry, které jsou při porovnání nukleotidových sekvencí identické z více než 84 %, by měly být považovány za jeden druh. Při výčtu dalších ISFs se proto přidrží přehledu, který publikovali Blitvich *et* Firth (2015). Tento přehled používá pro jednotlivé viry vždy jen jeden konkrétní název. Alternativně používaná pojmenování konkrétních virů uvádím souhrnně v tabulce číslo 1.

Potencionálně nové specificky hmyzí flaviviry, u kterých se podařilo osekvenovat

příliš malý úsek genomu (méně než 300 nukleotidů) na to, aby bylo možné s jistotou tvrdit, že se jedná o samostatné druhy (Blitvich *et al.*, 2015), představují *Aedes vexans* flavivirus, *Czech Aedes vexans* flavivirus, *Aedes cinereus* flavivirus a *Aedes cinereus/geminus* flavivirus. Krátké sekvence, které jsou ostatním dosud známým flavivirům příbuzné z méně než 84 %, byly dále nalezeny u komárů v Itálii (Calzoari *et al.*, 2010a, 2010b; Cerutti *et al.*, 2012), v Keni (Ochieng *et al.*, 2013), v Portugalsku (Osório *et al.*, 2014) a v Řecku (Papa *et al.*, 2014). Dvě sekvence ISFs (rovněž kratší než 300 nt) se podařilo detekovat také u samců druhu *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) z Alžírsko a bylo pro ně navrženo označení phlebotomine-associated flaviviruses (PAFVs), které má zdůraznit, že se jedná o první specificky hmyzí flaviviry nalezené u jiného dvoukřídlého hmyzu než u komárů (Moureau *et al.*, 2010). Ve Španělsku bylo rovněž detekováno několik kratších flavivirových sekvencí, řadících se při fylogenetických analýzách mezi ISFs, a to u různých druhů komárů (Aranda *et al.*, 2009; Sánchez-Seco *et al.*, 2010). Navíc zde byly nalezeny navzájem velice podobné sekvence ISFs, které mohou náležet stejnému druhu viru, u zástupců rodu *Phlebotomus* a komárů *Aedes detritus* a *Culiseta annulata* (Sánchez-Seco *et al.*, 2010).

Flaviviry specifické pro hmyz (respektive jim odpovídající sekvence, které nebyly pojmenovány) byly detekovány také u další skupiny hmyzu, a to u pakomárovitých (Chironomidae), ve Francii (Cook *et al.*, 2013). Těmito sekvencím se zdají být nejpodobnější (ze 60 %) sekvence nalezené později u druhu *Culex pipiens* v Itálii (Grisenti *et al.*, 2015). Jednotlivé specificky hmyzí flaviviry se podařilo charakterizovat v různé míře. Zatímco z některých jsou známy jen relativně krátké sekvence, u jiných se podařilo osekvenovat většinu genomu nebo dokonce genom celý. Část objevených ISFs byla navíc izolována na buněčných kulturách a podařilo se zachytit morfologii jejich virionů. Některé specificky hmyzí flaviviry byly objeveny opakovaně (ať už ve stejných či geograficky navzájem vzdálených regionech), zatímco jiné ISFs se podařilo detekovat pouze jednou (viz tabulka č. 1). Nemusí to však znamenat, že se na jiných místech nevyskytují. Rozdílné je u ISFs také spektrum hostitelů, ve kterých se konkrétní viry podařilo detekovat. V následující tabulce jsou zahrnuty pouze ISFs, u kterých se dá se předpokládat, že tvoří samostatné druhy a které byly pojmenovány.

Tabulka č. 1: Pojmenování, geografické rozšíření a hostitelské spektrum popsaných ISFs

Název viru*	Geografické rozšíření	Známí hostitelé	Zdroje informací**
<i>Aedes cinereus</i> flavivirus (AeciFV)	Velká Británie	<i>Ae. cinereus</i>	Calzoari <i>et al.</i> , 2012
<i>Aedes cinereus/geminus</i> flavivirus	Itálie	smíšený vzorek jedinců <i>Ae. cinereus</i> a <i>Ae. geminus</i>	Roiz <i>et al.</i> , 2012

Název viru*	Geografické rozšíření	Známí hostitelé	Zdroje informací**
Aedes flavivirus (AeFV)	Brazílie, Itálie, Japonsko, Thajsko, USA	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. flavopictus</i> , <i>Cx. pipiens</i>	Hoshino <i>et al.</i> , 2009; Calzoari <i>et al.</i> , 2010a; Calzoari <i>et al.</i> , 2012; Ravanini <i>et al.</i> , 2012; Roiz <i>et al.</i> , 2012; Haddow <i>et al.</i> , 2013; Grisenti <i>et al.</i> , 2015; Bolling <i>et al.</i> , 2015a; Fernandes <i>et al.</i> , 2016
Aedes galloisi flavivirus (AGFV)	Japonsko	<i>Ae. galloisi</i>	Hoshino <i>et al.</i> , 2012
Aedes vexans flavivirus (AeVeFV)	Česká republika, Itálie, Řecko	<i>Ae. vexans</i> , <i>Aedes</i> spp.	Calzoari <i>et al.</i> , 2012; Rizzo <i>et al.</i> , 2014; Papa <i>et al.</i> , 2016
Assam flavivirus	Indie	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Datta <i>et al.</i> , 2015
Barkedji virus (BJV)	Izrael, Senegal	<i>Cx. perexiguus</i>	Kolodziejek <i>et al.</i> , 2013; Genbank Acc. No. EU078325
Calbertado virus (CLBOV)	Kanada, USA	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. tarsalis</i>	Pabbaraju <i>et al.</i> , 2009; Bolling <i>et al.</i> , 2011; Tyler <i>et al.</i> , 2011
Cell fusing agent virus (CFAV)	Culebra, Indonésie, Mexiko, Portoriko, Thajsko, USA	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> , <i>Culex</i> spp.	Stollar <i>et Thomas.</i> , 1975; Cook <i>et al.</i> , 2006; Kihara <i>et al.</i> , 2007; Hoshino <i>et al.</i> , 2009; Espinoza-Gómez <i>et al.</i> , 2011; Bolling <i>et al.</i> , 2015a
Culex flavivirus (CxFV)	Argentina, Brazílie, Čína, Guatemala, Indonésie, Japonsko, Mexiko, Republika Trinidad a Tobago, Taiwan, Uganda, USA	<i>Anopheles sinensis</i> , <i>Cx. fuscocephala</i> , <i>Cx. interrogator</i> , <i>Cx. maxi</i> , <i>Cx. nigripalpus</i> , <i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. restuans</i> , <i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> , <i>Cx. usquatus</i>	Hoshino <i>et al.</i> , 2007; Morales-Betoulle <i>et al.</i> , 2008; Blitvich <i>et al.</i> , 2009; Cook <i>et al.</i> , 2009; Farfan-Ale <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2009; Saiyasombat <i>et al.</i> , 2010; Bolling <i>et al.</i> , 2011; Newman <i>et al.</i> , 2011; Crockett <i>et al.</i> , 2012; Huanyu <i>et al.</i> , 2012; Machado <i>et al.</i> , 2012; Chen <i>et al.</i> , 2013; Goenaga <i>et al.</i> , 2014; Liang <i>et al.</i> , 2015; Fernandes <i>et al.</i> , 2016

Název viru*	Geografické rozšíření	Známí hostitelé	Zdroje informací**
Culex theileri flavivirus (CTFV) Culex pipiens flavivirus, Mediterranean Culex flavivirus, Spanish Culex flavivirus (ScxFV), Wang Thong virus (WTV)	Portugalsko, Řecko, Španělsko, Thajsko	<i>Cx. fuscocephala</i> , <i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. theileri</i> , <i>Culex</i> spp.	Calzoari <i>et al.</i> , 2012; Parreira <i>et al.</i> , 2012; Vázquez <i>et al.</i> , 2012; Osório <i>et al.</i> , 2014; Papa <i>et al.</i> , 2014; GenBank Acc. Nos. AY457040, HE997068 – HE997069
Culiseta flavivirus (CsFV)	USA	<i>Culiseta melanura</i>	Misencik <i>et al.</i> , 2016
Czech Aedes vexans flavivirus (Czech AeveFV)	Česká republika	<i>Ae. vexans</i>	Calzoari <i>et al.</i> , 2012
Donggang virus (DONV)	Čína	<i>Aedes</i> spp.	Genbank Acc. No. NC_016997
Hanko virus (HANKV) Culicinae flavivirus, Marim virus, Mediterranean Ochlerotatus Flavivirus, Mosquito flavivirus, Ochlerotatus flavivirus (OcFV; OCFVPT), Ochlerotatus caspius flavivirus, Spanish Ochlerotatus flavivirus (SocFV)	Finsko, Itálie, Řecko, Portugalsko, Španělsko	<i>Ae. caspius</i> , <i>Ae. detritus</i> , <i>Ae. vexans</i> , <i>Aedes</i> spp., <i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. perexiguus</i> , <i>Cx. theileri</i> , <i>Cx. univittatus</i>	Calzoari <i>et al.</i> , 2012; Huhtamo <i>et al.</i> , 2012; Vázquez <i>et al.</i> , 2012; Ferreira <i>et al.</i> , 2013; Osório <i>et al.</i> , 2014; Papa <i>et al.</i> , 2016; GenBank Acc. Nos. EU716415 - EU716419 a EU716421 - EU716424; HQ676618
Chaoyang virus (CHAOV)	Čína, Korejská republika, Rusko	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. bekkui</i> , <i>Ae. vexans</i> , <i>Armigeres subalbatus</i> , <i>Cx. pipiens</i>	Liu <i>et al.</i> , 2011; Lee <i>et al.</i> , 2013; Takhampunya <i>et al.</i> , 2014; Pukhovskaya <i>et al.</i> , 2016
Ilomantsi virus (ILOV)	Finsko	<i>Aedes</i> spp., <i>Anopheles</i> spp.	Huhtamo <i>et al.</i> , 2014
Kamiti River virus (KRV)	Keňa	<i>Ae. macintoshi</i>	Sang <i>et al.</i> , 2003
Lammi virus (LAMV)	Finsko	<i>Aedes cinereus</i>	Huhtamo <i>et al.</i> , 2009; Huhtamo <i>et al.</i> , 2014
Marisma mosquito virus (MMV)	Itálie, Španělsko	<i>Ae. caspius</i>	Calzoari <i>et al.</i> , 2010b; Vázquez <i>et al.</i> , 2012; Pautasso <i>et al.</i> , 2013; Rizzo <i>et al.</i> , 2014
Mercadeo virus (MECDV)	Panama	<i>Culex</i> spp.	Carrera <i>et al.</i> , 2015

Název viru*	Geografické rozšíření	Známí hostitelé	Zdroje informací**
Nakiwogo virus (NAKV)	Uganda	<i>Mansonia africana nigerrima</i>	Cook <i>et al.</i> , 2009
Nanay virus (NANV)	Peru	<i>Culex ocosa</i>	Evangelista <i>et al.</i> , 2013
Nhumirim virus (NHUV)	Brazílie	<i>Culex chidesteri</i>	Pauvolid-Corrêa <i>et al.</i> , 2014
Nienokoue virus (NIEV)	Pobřeží slonoviny	<i>Culex</i> spp.	Genbank Acc. No. NC_024299
Nounané virus (NOUV)	Pobřeží slonoviny	<i>Uranotaenia mashaensis</i>	Junglen <i>et al.</i> , 2009
Palm Creek virus (PCV)	Austrálie	<i>Coquillettidia xanthogaster</i>	Hobson-Peters <i>et al.</i> , 2013; McLean <i>et al.</i> , 2015
Parramatta River virus (PaRV)	Austrálie	<i>Ae. vigilax</i>	McLean <i>et al.</i> , 2015
Quang Binh virus (QBV) Yunnan Culex flavivirus (YNCxFV)	Čína, Vietnam	<i>Anopheles sinensis</i> , <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Crabtree <i>et al.</i> , 2009; Zuo <i>et al.</i> , 2014
Xishuangbanna flavivirus (XFV)	Čína	<i>Ae. albopictus</i>	Fan <i>et al.</i> , 2016
Yamadai flavivirus (YDFV)	Japonsko	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Kuwata <i>et al.</i> , 2015a

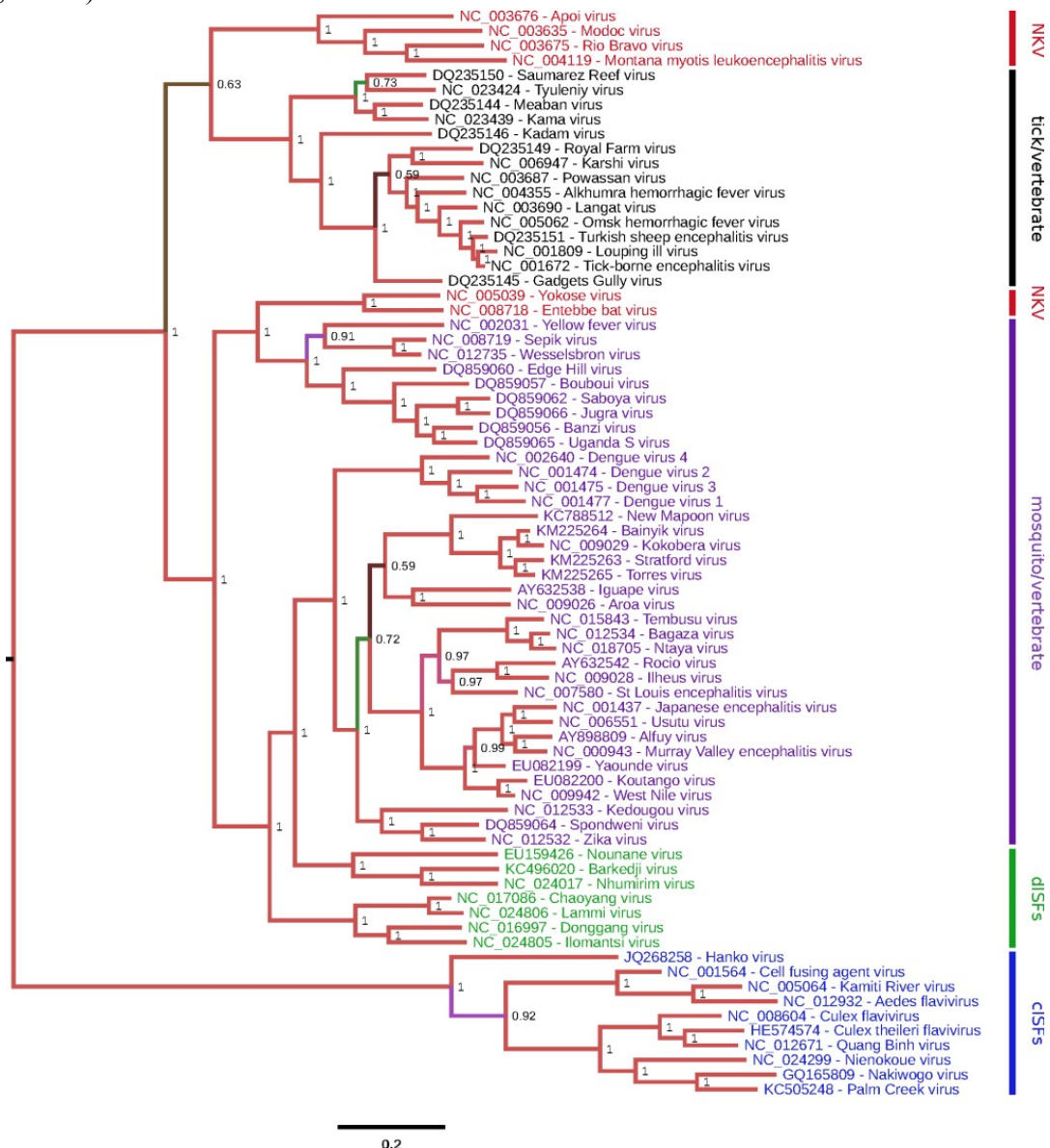
* Některé ISFs byly popsány vícekrát nezávisle na sobě pod různými názvy. Uvedeny jsou zde všechny a zvýrazněn je vždy ten z nich, který Blitvich *et al.* (2015) navrhl používat pro konkrétní druh viru.

** Jako zdroj informací jsou v tabulce uvedena také přístupová čísla do genové banky GenBank®, National Center for Biotechnology Information (30. 7. 2016), a to pouze v případě, že objev daného viru z určité oblasti či z jednotlivých druhů komárů nebyl publikován. Stejně tak je tomu, pokud je pro sekvenci uloženou v této databázi zvolen jiný název, než v publikovaných článcích, což může být při porovnání sekvencí ISFs matoucí.

Počet nově objevovaných ISFs se stále zvyšuje a již zaznamenané druhy jsou detekovány u nových druhů hostitelů. Calzolari *et al.* (2015) uvádí, že vzhledem k těmto pozorovaným skutečnostem by názvy druhů ISFs neměly odkazovat na jinou taxonomickou jednotku (prvního zjištěného hostitele), neboť taková pojmenování jsou zavádějící. Široké spektrum hostitelů některých druhů ilustruje tabulka č. 1, stejně jako fakt, že u jednoho druhu komára může být nalezeno několik rozdílných ISFs.

2.3 Fylogeneze a evoluce ISFs

ISFs mohou být rozděleny do dvou fylogeneticky od sebe vzdálených skupin (viz obrázek č. 1). Dle Blitviche a Firtha (2015), autorů jednoho z nejnovějších přehledů, budu pro tyto dvě skupiny používat označení „klasické flaviviry specifické pro hmyz“ (classical ISFs, cISFs) a „flaviviry specifické pro hmyz příbuzné dvouhostitelským flavivirům“ (dual-host affiliated ISFs, dISFs).



Obrázek č. 1: Fylogenetický strom rodu *Flavivirus*.

Strom byl sestaven na základě porovnání kompletních sekvencí aminokyselin kódujících flavivirový polyprotein. NKV – No Known Vector flaviviruses, dISFs – dual-host affiliated ISFs, cISFs – classical ISFs. Převzato z Blitvich *et* Firth, 2015.

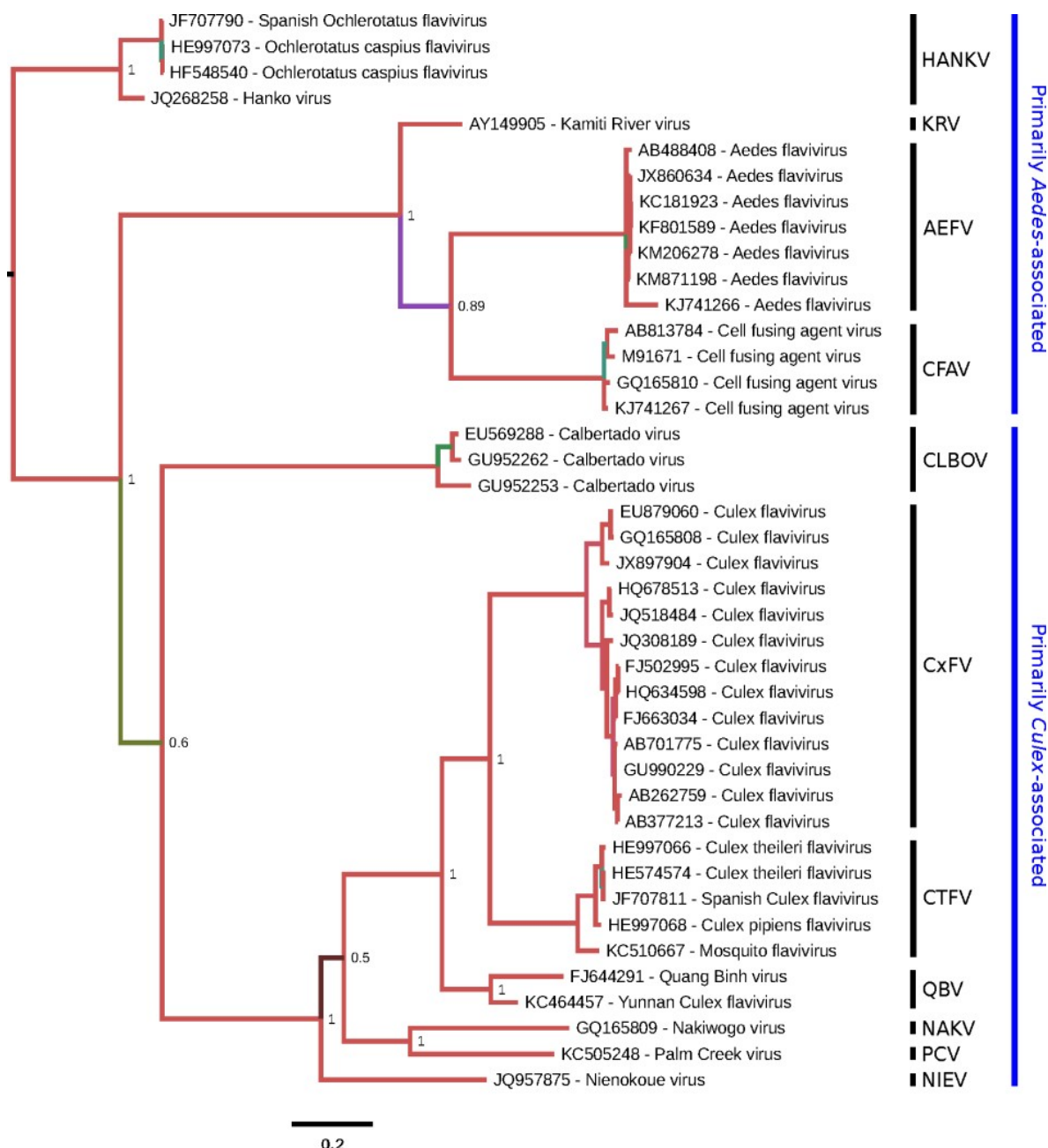
2.3.1 Klasické flaviviry specifické pro hmyz

Mezi cISFs patří většina dosud objevených flavivirů specifických pro hmyz a tato skupina je fylogeneticky vzdálená od všech ostatních známých flavivirů (Blitvich *et* Firth, 2015). Jejimi zástupci jsou například Aedes flavivirus, Cell fusing agent, Culex flavivirus, Kamiti River virus, Nakiwogo virus, Palm Creek virus, Quang Binh virus a většina dalších flavivirů zmíněných v předchozí kapitole, přičemž o některých se diskutuje, zdali jsou samostatnými druhy nebo zda se jedná o kmeny již dříve popsanych druhů (Blitvich *et* Firth, 2015).

Na základě podrobné analýzy dosud zveřejněných sekvencí genu pro nestrukturní protein 5 (NS5) se zdá, že cISFs představují nejstarší linii čeledi *Flaviviridae*. Jejich vlastnosti spolu s rozšířením na všech kontinentech (pochopitelně s výjimkou Antarktidy) naznačují, že by cISFs mohly představovat předka všech flavivirů s tím, že jejich schopnost infikovat obratlovce (a s tím spojená patogenita) byla získána později během evoluce (Firth *et al.*, 2010; Calzoari *et al.*, 2015). Pozorovaný vertikální přenos ISFs poukazuje na možnou schopnost těchto virů dlouhodobě se udržovat v hostitelských populacích, a tedy se vyvíjet a diverzifikovat společně se svými hostiteli (Bolling *et al.*, 2015b). Zdá se, že některé z těchto flavivirů se dokonce integrovaly do genomu svých hostitelů (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Katzourakis *et* Gifford, 2010; Rizzo *et al.*, 2014). Experimenty se zástupci skupiny cISFs potvrdily přítomnost genetických faktorů, které virům umožňují diseminovat do slinných žláz komárů a vytvořit z nich tak svého vektora (Kent *et al.*, 2010; Saiyasombat *et al.*, 2011). To by mohlo potvrzovat hypotézu, že v současnosti hojně objevované ISFs mají potenciál vyvinout se v dvouhostitelské viry (Bolling *et al.*, 2015b).

Extrémní genetická odlišnost cISFs (až ~60% na úrovni aminokyselin) je srovnatelná s rozdíly mezi třemi současně uznávanými rody čeledi *Flaviviridae*, což vede některé autory k přesvědčení, že cISFs by měly být zahrnuty do zcela nového rodu v rámci této čeledi virů (Moureau *et al.*, 2015).

Klasické flaviviry specifické pro hmyz se dělí do dvou hlavních fylogenetických linií (viz obrázek č. 2) podobně jako flaviviry přenášené komáry na obratlovce (Mosquito Borne Flaviviruses, MBFs) (Roiz *et al.*, 2009; Blitvich *et* Firth, 2015; Moureau *et al.*, 2015). První z nich je složena z cISFs, které jsou asociovány především s komáry rodu *Aedes*, zatímco druhou skupinu tvoří viry, které jsou z převážné většiny asociovány s rodem *Culex*. Virus Hanko je pak odlišný od obou těchto linií a mohl by být považován za (zatím) jediného zástupce třetí skupiny (Blitvich *et* Firth, 2015). Hostitelská specifita cISFs, kterou toto rozdělení naznačuje, je ovšem složitější a je blíže rozvedena v tabulce č. 1.



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom monofyletické skupiny kaskických flavivirů specifických pro hmyz (cISFs) rodu *Flavivirus*. Strom zobrazuje monofyletickou skupinu virů převážně asociovanou s rodem *Culex* a dvě monofyletické skupiny, které jsou asociovány především s komáry rodu *Aedes*. Převzato z Blitvich *et* Firth, 2015.

2.3.2 Flaviviry specifické pro hmyz příbuzné dvouhostitelským flavivirům

Menší počet popsanych zástupců má skupina dISFs, která navíc není monofyletická (Blitvich *et Firth*, 2015). Mezi dISFs se řadí Barkedji virus, Donggang virus, Chaoyang virus, Ilomantsie virus, Lammi virus, Marisma mosquito virus, Nanay virus, Nhumirim virus a Nounané virus (Kenney *et al.*, 2014; Carrera *et al.*, 2015; Moureau *et al.*, 2015). Ty lze rozdělit do dvou skupin, tzv. „LAMV group“ a „NOUV group“, které jsou obě blízce příbuzné MBFs, přestože není prokázáno, že by mohly obratlovce nakazit.

Z dostupných dat vyplývá, že „NOUV group“ sdílí nejbližšího společného předka s MBFs a ne s ostatními druhy řazenými mezi dISFs, což ještě více nabourává představu, že se fylogeneze flavivirů dá odvodit ze vztahu hostitel–vektor (Kenney *et al.*, 2014). Nabízí se vysvětlení, že dISFs představují nezávislé linie virů, které v průběhu evoluce ztratily část genetických vlastností umožňující střídání hostitele, podobně jako skupina označovaná názvem „No Known Vector Flaviviruses“ (viz výše), aniž by to mělo vliv na jejich dlouhodobé přetrvávání v prostředí (Kenney *et al.*, 2014; Moureau *et al.*, 2015). Lze uvažovat také o tom, že se naopak jedná o vzdálené skupiny cISFs, které schopnost replikace v buňkách obratlovců nikdy nezískaly. Jinou eventualitu představuje hypotéza, že tyto viry jsou na obratlovce přenášeny, ale obratlovčí hostitelé konkrétních zástupců zatím nebyli objeveni (Kenney *et al.*, 2014).

Zajímavostí je, že nedávná studie zařazuje virus Rabensburg (RABV, jedna z linií viru západonilské horečky (WNV) či podle jiných názorů samostatný druh rodu *Flavivirus*) k virům specifickým pro hmyz. Její autoři o něm uvažují také jako o evolučním mezičlánku mezi flaviviry přenášenými komáry na obratlovce a ISFs (Aliota *et al.*, 2012). K těmto závěrům je vedly různé pokusy srovnávající RABV s ostatními kmeny WNV a pro tuto hypotézu svědčí také porovnání nukleotidové sekvence RABV s reprezentativními zástupci MBFs i ISFs (které autoři bohužel nejmenují). Další zkoumání viru Rabensburg by proto mohlo pomoci k objasnění genetických změn, které flavivirům usnadňují střídání hostitelů a potencionálně vedou ke vzniku nových obratlovčích patogenů (Aliota *et al.*, 2012).

2.4 Integrace ISFs do genomu hostitelů a jejich DNA v buněčných kulturách

Trvalá integrace virových genů do genomu hostitele je umožněna tehdy, pokud virus infikuje zárodečné (germinální) buňky organismu. Některé viry jsou schopné se včlenit do DNA napadené buňky, např. pomocí integrázy. Vložené virové sekvence (endogenous viral elements, EVEs) se tímto způsobem mohou stát součástí chromozomů, a být tak přenášeny do dalších generací jako hostitelské alely. Z genomu hostitele však většinou bývají eliminovány během několika málo generací (Katzourakis *et al.*, 2010).

Výjimku v tomto ohledu tvoří retroviry, které v rámci svého životního cyklu reverzní transkripci a integraci do hostitelského genomu využívají obligátně – mají proto predispozici proniknout do zárodečných buněk živočichů a v genomu dané populace se udržet trvale. Pro tyto dlouhodobě přenášené retrovirové sekvence se také někdy užívá označení „endogenní retroviry“. Existují i další EVEs, nalezené u živočichů, rostlin i kvasinek, které v genomu svých hostitelů přetrvávají dlouhodobě v rámci mnoha generací, ačkoliv mezi retroviry nepatří. Tyto „endogenní viry“ mají původ v čeledích *Dicistroviridae* (Maori *et al.*, 2007), *Nudiviridae* (Bézier *et al.*, 2009), *Totiviridae* (Taylor *et al.*, 2009), *Bornaviridae* (Horie *et al.*, 2010), *Filoviridae* (Taylor *et al.*, 2010), *Betaflexiviridae* (Chiba *et al.*, 2011), *Partitiviridae* (Chiba *et al.*, 2011) či *Flaviviridae* (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Katzourakis *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2014). Mechanismus genové integrace virů z těchto čeledí pravděpodobně spočívá v rekombinaci jejich genetické informace s endogenními retroviry (Geuking *et al.*, 2009; Roiz *et al.*, 2009; Horie *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2010) či pararetroviry (Chiba *et al.*, 2011).

Endogenní viry zřejmě ovlivnily evoluci některých hostitelských druhů a představují pro ně určitou výhodu. Klasickým příkladem jsou integrované retrovirové geny, které jsou nutné pro tvorbu placenty, a hrály tak pravděpodobně klíčovou roli v evoluci placentálních savců (Dunlap *et al.*, 2006; Dupressoir *et al.*, 2009; Dupressoir *et al.*, 2012; Esnault *et al.*, 2013; Cornelis *et al.*, 2014). Podobný příklad využití sekvencí virového původu hostitelem představují EVEs v genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a několika dalších druhů rostlin, které zčásti tvoří gen podílející se na regulaci důležitého rostlinného hormonu auxinu (Chiba *et al.*, 2011). Za vůbec nejkomplexnější dosud objevené endogenní viry lze považovat takzvané bracoviry a ichnoviry (Bézier *et al.*, 2013; Jancek *et al.*, 2013). Ty se vyskytují ve formě proviru (sekvencí, které umožňují produkci virových partikulí) v chromozomech lumků a lumčíků (Ichneumonidae a Braconidae). Díky tomu se viriony

bracovirů a ichnovirů tvoří přímo v reprodukčních orgánech samic těchto hmyzích parazitoidů a jsou následně spolu s vajíčky lumků a lumčků vpravovány do jimi napadených housenek. U těch inhibují jednotlivé složky hmyzího imunitního systému, a umožňují tak víceméně bezproblémový vývoj larev parazitoidů (Bézier *et al.*, 2009; Jancek *et al.*, 2013). Koevoluce s viry tak zřejmě usnadnila parazitický způsob života těmto parazitoidům, včetně adaptace konkrétních druhů na lokálně rozšířené druhy hostitelů, např. motýlů (Lepidoptera), na kterých mohou parazitovat (Thézé *et al.*, 2011; Jancek *et al.*, 2013). K integraci virových sekvencí došlo u čeledí Ichneumonidae a Braconidae opakovaně (Pichon *et al.*, 2015), jak dokazuje mimo jiné to, že různé vývojové linie těchto parazitoidů mají ve svém genomu integrované sekvence rozdílných druhů virů (Herniou *et al.*, 2013). Koevoluce mezi těmito viry a jejich hostiteli vedla dokonce k tomu, že virové partikule produkované ve vaječnicích lumků a lumčků obsahují transpozony tohoto blanokřídlého hmyzu. Část jejich genetické informace se tak prostřednictvím virionů může přenášet do hostitelů, což představuje jeden ze způsobů horizontálního genového přenosu mezi navzájem odlišnými druhy hmyzu (Dupuy *et al.*, 2011).

Výše zmíněné příklady poukazují na komplexní evoluční vztahy mezi viry a jejich hostiteli. Záznamy dávných interakcí, které virové sekvence vložené do genomu různých organismů představují, tak mohou pomoci při rekonstrukci vývoje některých druhů (Katzourakis *et al.*, 2010). Zejména RNA viry jsou charakteristické svojí obrovskou genetickou diverzitou a schopností rychlého vývoje díky záměnám nukleotidů. Při integraci do hostitelského genomu proto mohou představovat vhodný genetický materiál pro následnou evoluci a diverzifikaci eukaryotických buněk, které jsou oproti virům geneticky mnohem stabilnější (Crochu *et al.*, 2004).

Mezi RNA viry, které jsou schopné integrace do genomu svých hostitelů, patří také specificky hmyzí flaviviry (ISFs). Jediný otevřený čtecí rámec všech flavivirů kóduje velký polyprotein, který následně dává vzniknout třem strukturálním a sedmi nestrukturálním proteinům (NS). Mezi strukturální patří protein kapsidový (C), membránový (M), který je tvořen ze svého prekurzoru (prM), a obalový (E). Pořadí genů v otevřeném čtecím rámci je následující: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-3'.

Úsek DNA, který odpovídá genu pro nestrukturní protein 3 (NS3) flavivirů, byl detekován u tkáňové kultury buněk C6/36 odvozené z komárů druhu *Aedes albopictus*. Vzhledem k tomu, že se sekvence při fylogenetické analýze řadila mezi cISFs a neodpovídala žádnému dosud popsánému viru, dostala název Cell silent agent (CSA) (Crochu *et al.*, 2004). Přesná povaha nukleových kyselin CSA byla ověřena použitím nukleáz – použití ribonukleázy

(RNázy) nezabránilo následné PCR amplifikaci, zatímco použití deoxyribonukleázy (DNázy) stejně jako restrikčních enzymů (endonukleáz), které štěpí jen dvouvláknovou DNA (dsDNA), vedlo k negativním výsledkům reakce. Tím se jednoznačně potvrdilo, že CSA je v kultuře přítomen ve formě molekuly dsDNA (Crochu *et al.*, 2004). Metodou postupného sekvenování genomu (genome-walking) buněk C6/36 se podařilo detekovanou sekvenci rozšířit o další části a dokonce najít nové virové sekvence, které na původní objevený segment nenavazovaly. Ohraničující nukleotidové sekvence těchto úseků jsou nevirového původu a patří ke genomu komářích buněk, což prokázalo integraci virových sekvencí do genomu buněk na třech různých inzerčních místech (Crochu *et al.*, 2004). Největší integrovaný segment obsahuje otevřený čtecí rámec (ORF), který odpovídá zhruba polovině flavivirového polyproteinu – 1557 aminokyselinám, které jsou homologické proteinům NS1, NS2A, NS2B, NS3 a NS4A. Následná detekce odpovídajících mediátorových RNA (mRNA) je důkazem, že získané geny jsou hostitelskými buňkami využívány. Další EVEs jsou naopak oproti stejným úsekům u flavivirů zkráceny a obsahují mnoho terminačních kodonů, které prakticky vylučují možnost vzniku funkčního produktu (Crochu *et al.*, 2004). Sekvence CSA byly nalezeny i u laboratorně chovaných a volně žijících komárů druhu *Ae. albopictus*. Jednalo se o jedince různého geografického původu a pohlaví, ve všech vývojových stádiích. Tím se potvrdilo, že flavivirové EVEs jsou u *Ae. albopictus* rozšířené a nejsou artefaktem manipulace s buněčnou linií C6/36 (Crochu *et al.*, 2004). Tyto výsledky potvrdila i pozdější nezávislá studie (Katzourakis *et Gifford*, 2010). U komárů *Ae. albopictus* odchycených na severu Itálie byly navíc nalezeny sekvence DNA integrované z jiného flaviviru než CSA, který rovněž při fylogenetických analýzách náleží mezi cISFs (Roiz *et al.*, 2009). Zdá se tedy, že integrace úseků flavivirové dědičné informace se u stejného druhu komára odehrála opakovaně, pravděpodobně jako následek infekce různými cISFs (Roiz *et al.*, 2009).

Sekvence ve formě dsDNA podobná NS5 sekvenci flavivirů byla nalezena také u druhu *Aedes aegypti*. Tato sekvence, která neobsahuje funkční motivy polymerázy, byla odlišná od dříve popsané odpovídající sekvence u druhu *Ae. albopictus*, a byla proto označena jako Cell silent agent 2 (CSA2). Podobně jako u CSA bylo zjištěno, že její ohraničení tvoří nevirové sekvence, což prokázalo integraci do hostitelského genomu. Důkazy integrace viru byly rovněž nalezeny v buněčné linii A20 získané z *Ae. aegypti*, stejně jako u laboratorně chovaných i volně žijících jedinců tohoto druhu (Crochu *et al.*, 2004). Podrobná studie genomu *Ae. aegypti* pak pomohla identifikovat fragmenty, které dohromady pokrývají skoro celý flavivirový genom (Katzourakis *et Gifford*, 2010). Fylogenetické analýzy i v tomto případě potvrdily, že virus, který se do genomu integroval, náleží mezi cISFs (Crochu *et al.*,

2004; Katzourakis *et al.*, 2010).

Sekvence flavivirového původu odpovídající úseku pro NS5, které byly původně popsány jako *Aedes vexans* flavivirus (AeVeFV), se integrovaly do genomu nejméně čtyř druhů komárů: *Ae. vexans*, *Ae. albopictus*, *Ae. geniculatus* a *Ae. caspius* (Rizzo *et al.*, 2014). Objevené vložené segmenty AeVeFV mají nefunkční terminační kodon na 3' konci, což je pochopitelné, protože komáři nepotřebují funkční RNA-dependentní RNA polymerázu, kterou gen pro NS5 kóduje (Rizzo *et al.*, 2014). Ačkoliv důkaz integrace AeVeFV byl nalezen pouze u komárů odchycených během jedné studie v Itálii (Rizzo *et al.*, 2014), AeVeFV byl zaznamenán ve formě DNA i u komárů z České republiky a Řecka (Calzolari *et al.*, 2012; Papa *et al.*, 2016).

Navzájem velice podobné flavivirové sekvence ve formě DNA byly nalezeny také u komárů *Ae. caspius*, *Ae. detritus* a *Culiseta annulata* ze Španělska. Odlišné sekvence (rovněž v DNA formě) pak byly během stejného výzkumu detekovány u druhu *Ae. vexans* (Vázquez *et al.*, 2012). Ve vzorcích, kde byly tyto sekvence objeveny, nebyla identifikována žádná virová RNA a některé otevřené čtecí rámce obsahovaly terminální kodony, z čehož autoři vyvozují (ačkoliv to není zcela potvrzeno), že se i v těchto případech jedná o integraci virů, řadících se jako ve všech předchozích případech k cISFs, do genomu hostitelů (Vázquez *et al.*, 2012).

V souvislosti s výše uvedenými fakty je zajímavé zmínit i fenomén, zaznamenaný při inokulaci viru Cell fusing agent (CFAV) do buněčných kultur C6/36 a AA23, které obě pocházejí z komárů *Ae. albopictus*. Genetická informace CFAV byla v supernatantu nalezena ve formě RNA, v peletu buněk se ji však podařilo detekovat také ve formě DNA. Při sekvenaci se potvrdilo, že obě detekované formy si navzájem odpovídají a sekvence CFAV jsou dobře rozlišitelné od CSA, který je do genomu buněk integrován. Spontánní vytváření DNA forem virového genomu bylo potvrzeno i při infekci buněk A20 a *Aedes W-albus* pocházejících z druhu *Ae. aegypti*. U některých ISFs tedy zřejmě existuje vysoce účinný mechanismus reverzní transkripce, což představuje jednu z potenciálních cest, kterými může docházet k integracím sekvencí ISFs do genomu komárů (Cook *et al.*, 2006). Tuto hypotézu potvrzují i výsledky pokusů, při kterých byly *Culex* flavivirus a Nakiwogo virus inokulovány do kultur buněk C6/36. Šest dní po infekci byla v obou případech v buňkách potvrzena přítomnost sekvencí těchto flavivirů ve formě DNA (Cook *et al.*, 2009). Zajímavé je, že podobný jev, který vedl k integraci virových sekvencí do genomu buněk, byl již dříve popsán u viru klíšťové encefalitidy, který patří rovněž mezi flaviviry (sekund. citace Drynov *et al.*, 1981).

Z výše uvedeného vyplývá, že samotné zachycení flavivirových sekvencí ve vzorcích není důkazem přítomnosti viru. Ideálním a jediným nezpochybnitelným způsobem je ověření přítomnosti virových částic po inokulaci vzorku do buněčné kultury, které je ale mnohdy neúspěšné (Vázquez *et al.*, 2012). Detekce sekvencí ve formě RNA (bez přítomnosti odpovídající DNA, jelikož se může jednat také o mRNA vznikající z vložených virových sekvencí) je také důležitou indicií – za tímto účelem doporučují různí autoři u zkoumaných vzorků zejména použití DNázy, izolaci celkové RNA a zároveň i DNA či provedení PCR izolované RNA bez předchozí reverzní transkripce (Crochu *et al.*, 2004; Cook *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2011; Calzoari *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2012). Pro vyloučení kontaminace integrovanou DNA u vzorků, které se zdají být pozitivní na přítomnost viru, je také užitečné z části těchto vzorků vytvořit kontroly, ke kterým se přidá RNáza a následně se provede PCR bez předchozí reverzní transkripce (Sánchez-Seco *et al.*, 2010).

Proces integrace virových sekvencí do genomů hostitelů zřejmě není tak výjimečnou záležitostí, jak se dříve předpokládalo. Mechanismus, jakým k reverzní transkripci flavivirové RNA a následnému včlenění do genomu dochází, není dosud objasněn (Vázquez *et al.*, 2012; Blitvich *et al.*, 2015), integracím však pravděpodobně předcházejí infekce hostitelů specifickými hmyzími flaviviry. Jak již bylo zmíněno výše, různé druhy komárů byly zřejmě nakažené odlišnými ISFs, což spolu s různorodostí vložených virových sekvencí v rámci jednoho druhu dokazuje, že k včlenění ISFs do hostitelských genomů došlo v minulosti opakovaně (Crochu *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2012). Vliv vložených virových sekvencí na náchylnost komárů k virovým nákazám ani na jejich vektorovou kompetenci nebyl dosud zkoumán (Vázquez *et al.*, 2012).

Složitost interakcí mezi druhy čeledi *Flaviviridae* a jejich hostiteli potvrdila také studie, která se zaměřila na podobnost určitých dinukleotidových motivů v genomech virů a obratlovců, které tyto viry mohou nakazit. Získaná data naznačují, že viry infikující obratlovce napodobují ve svém genomu určité specifické sekvence hostitelské mRNA, což zřejmě napomáhá jejich ochraně před imunitní odpovědí nakaženého organismu. Tyto mimetizující sekvence se liší mezi viry přednostně infikujícími ptáky a savce, u ISFs se pak vyskytují jen některé z nich. To je v souladu se zmíněnou hypotézou, protože imunitní odpověď hmyzu funguje na jiných principech než imunita obratlovců (Lobo *et al.*, 2009). Při následné analýze určitých proteinových sekvencí se ISFs řadily do stejné skupiny jako jejich hostitelé – zdá se tedy, že tyto flaviviry také na základě selekčního tlaku svých hostitelů změnily některé části svého genomu, což jim podle autorů mohlo pomoci k trvalým nákazám populací komárů (Lobo *et al.*, 2009).

2.5 Experimentální infekce komářích buněk

V současnosti existuje více než 500 hmyzích buněčných linií, z nichž více než 20 pochází z komárů (Culicidae) (Walker *et al.*, 2014). Komáří buněčné linie mají svůj původ u různých druhů rodů *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* a *Toxorhynchites*. Ve většině případů se jedná o linie buněk získaných z larev a embryí druhů, které jsou vektory významných medicínských a veterinárních onemocnění. Výjimku v tomto ohledu tvoří linie TRA-171 z druhu *Toxorhynchites amboinensis*, u kterého samice krev nesají, a nemohou tedy patogeny na obratlovce přenášet (Walker *et al.*, 2014).

Komáří buněčné linie se používají ke studiu rozmanitých jevů jako je humorální a buněčná imunitní odpověď a tvorba proteinů souvisejících s hormonální odpovědí u hmyzu, hlavním využitím je však *in vitro* studium vnímavosti jednotlivých druhů komárů k různým arbovirovým infekcím a izolace arbovirů ze vzorků získaných odchytom volně žijících komárů (Walker *et al.*, 2014).

Pro účely zachycení a izolace arbovirů je nejčastěji využívána linie buněk C6/36 z komárů *Ae. albopictus* (Walker *et al.*, 2014). Jedním z důvodů může být fakt, že většina komářích buněčných linií není komerčně dostupná a je možné je získat pouze z laboratoří, které s konkrétními kulturami pracují. Například American Type Cell Collection (ATCC) nabízí pouze tři linie komářích buněk a buňky C6/36 jsou mezi nimi (Walker *et al.*, 2014). Kromě dostupnosti hraje významnou roli také to, že tato linie buněk má omezenou antivirovou imunitní odpověď (využívající mechanismu RNA interference), a je tak vnímavá pro široké spektrum virů (Brackney *et al.*, 2010).

Právě existence komářích buněčných linií umožnila izolaci a studium specificky hmyzích flavivirů, které se v žádných obratlovčích buňkách nemnoží. Díky metodě detekce arbovirů, při které se vzorky z terénních odchytů přidávají do komářích buněčných kultur, bylo také mnoho ISFs objeveno (např. Sang *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Huanyu *et al.*, 2012). Blitvich *et al.* (2015) uvádějí, že všechny popsání klasické specificky hmyzí flaviviry (cISFs) jsou schopné se v buňkách C6/36 množit. Na druhou stranu ale zdaleka ne všechny pokusy o infekci této buněčné linie jednotlivými specificky hmyzími flaviviry byly úspěšné (Pabbaraju *et al.*, 2009; Calzoari *et al.*, 2010a; Calzoari *et al.*, 2012; Hoshino *et al.*, 2012; Roiz *et al.*, 2012; Grisenti *et al.*, 2015).

Cell fusing agent, první popsáný ISF, byl objeven právě díky tomu, že v kultuře buněk C6/36 vedl k tvorbě výrazných a velkých syncytií (Stollar *et al.*, 1975). Cytopatický

efekt (CPE) na buňky C6/36 mají i mnohé další ISFs, infekce těmito viry však může mít na buňky i velice mírný a těžko pozorovatelný vliv (např. Huhtamo *et al.*, 2012). Obecně je CPE působený ISFs u buněk C6/36 charakterizovaný změnou tvaru buněk, shlukováním buněk a tvorbou syncytií, větším množstvím plovoucích buněk, které nejsou přichycené ke dnu, a v některých případech také rozpadem a smrtí buněk (Crabtree *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2009; Crabtree *et al.*, 2009; Bolling *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Parreira *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Huhtamo *et al.*, 2014; Kenney *et al.*, 2014; Carrera *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016). Cytopatický efekt určitých specificky hmyzích flavivirů se může projevit až při následných pasážích na buňkách C6/36, zatímco při primární inokulaci jej není možno zaznamenat (Junglen *et al.*, 2009; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Carrera *et al.*, 2015). Jsou však známy i takové ISFs, které cytopatický efekt na buňky C6/36 nemají, přestože se v nich prokazatelně množí (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2014; Misencik *et al.*, 2016). Výskyt a projevy CPE se mohou lišit i v rámci jednoho druhu viru u různých kmenů či izolátů, jak se ukázalo u CFAV (Carrera *et al.*, 2015), CxFV (Hoshino *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Bolling *et al.*, 2011; Huanyu *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013), AeFV (Hoshino *et al.*, 2009; Roiz *et al.*, 2012; Haddow *et al.*, 2013; Bolling *et al.*, 2015a), HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012; Vázquez *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013) a CHAOV (Liu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013).

Kvůli výše zmíněným okolnostem považují někteří autoři za potřebné prověřovat přítomnost flavivirů i u kultur, u kterých se CPE neobjeví, pomocí metody PCR (Hobson-Peters *et al.*, 2013; Carrera *et al.*, 2015). Existuje však i popsáný případ, ve kterém byl u kultury buněk C6/36 po inokulaci vzorku pozorován CPE, avšak přítomnost flavivirové RNA polymerázovou řetězovou reakcí se podařilo potvrdit až po čtvrté pasáži viru (Bolling *et al.*, 2011).

Schopnost replikace v jiných komářích buněčných liniích než v buňkách C6/36 byla prověřována pouze u několika ISFs. Virus Kamiti River je schopen se množit také v buňkách AP-61 pocházející z druhu *Aedes pseudoscutellaris* a v buňkách z komárů *Ae. aegypti* (blíže nespecifikované linie), na které na rozdíl od buněk C6/36 nepůsobí cytopaticky (Crabtree *et al.*, 2003). Quang Binh virus je také schopen replikace i v buňkách AP-61 a cytopatický efekt zde způsobuje (Crabtree *et al.*, 2009). Replikace CxFV a AeFV byla zaznamenána v buňkách AeAl-2, které stejně jako linie C6/36 pocházejí z jedinců druhu *Ae. albopictus* (Hoshino *et al.*, 2007; Hoshino *et al.*, 2009). *Aedes flavivirus* se množí také v buňkách linie ATC-10 z komárů *Ae. aegypti* (Hoshino *et al.*, 2009). Cytopatický efekt byl po inokulaci Ilomantsi viru i Lammi viru pozorován u komářích buněk AE, AA23 a A20 (Huhtamo *et al.*, 2014). Autoři bohužel

původ těchto buněk blíže nerozvádějí. Nhimirim virus je schopen se množit v buňkách C7/10 (*Ae. albopictus*) a v jedné z buněčných linií pocházejících z komárů *Culex quinquefasciatus*. Stejný virus byl inokulován také na buněčnou kulturu ISE6 pocházející z klíšťat *Ixodes scapularis*, zde se však NHUV neuchytil (Kenney *et al.*, 2014). Parramatta River virus byl zkoumán v buněčných kulturách RML-12 (*Ae. albopictus*), HSU (*Cx. quinquefasciatus*), Chao ball (*Cx. tarsalis*) a MOS55 (*Anopheles gambiae*), jeho replikace se však prokázala pouze v liniích buněk odvozených z komárů rodu *Aedes* (C6/36 a RML-12), z čehož je možné vyvozovat určitou hostitelskou specifitu tohoto viru (McLean *et al.*, 2015). Cell fusing agent se množí v buňkách AA23 (*Ae. albopictus*), A20 (*Ae. aegypti*) a *Aedes W-albus* (Cook *et al.*, 2006).

2.6 Experimentální infekce obratlovčích buněk

Flaviviry specifické pro hmyz nebyly dosud nikdy izolovány z žádného obratlovce a při pokusech o infekce obratlovčích buněčných linií se žádný z ISFs nebyl schopen v takových buňkách replikovat (Blitvich *et al.*, 2015).

Většina pokusů (s více než dvaceti různými druhy ISFs) byla prováděna na kulturách epiteliálních buněk ledvin kočkodanů, tzv. Vero buňkách (např. Stollar *et al.*, 1975; Sang *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2015; Misencik *et al.*, 2016). Opičí buněčné kultury, které byly použity v různých experimentech s ISFs, dále představují linie buněk BGM a MA104 z kočkodanů (Huhtamo *et al.*, 2014) a linie buněk LLCMK z makaků (Crabtree *et al.*, 2009; Farfan-Ale *et al.*, 2009; Evangelista *et al.*, 2013).

U mnoha různých specificky hmyzích flavivirů se prověřovala jejich schopnost infikovat kultury BHK buněk, tedy buněk z ledvin mláďat křečků (např. Stollar *et al.*, 1975; Sang *et al.*, 2003; Huanyu *et al.*, 2012; McLean *et al.*, 2015; Misencik *et al.*, 2016). Kultura odvozená z buněk prasečích ledvin byla také použita v některých experimentech (Junglen *et al.*, 2009; Hobson-Peters *et al.*, 2013), stejně jako kultura koňských ledvinných buněk (Hobson-Peters *et al.*, 2013). Dalšími savčími buněčnými liniemi, se kterými byly prováděny pokusy o infekci specificky hmyzími flaviviry, jsou myší buňky Neuro 2A a L929 (Huhtamo *et al.*, 2009; Huhtamo *et al.*, 2014) a psí buňky MCDK (Evangelista *et al.*, 2013; Huhtamo *et al.*, 2014).

Potenciál ISFs nakazit lidské buňky byl ověřován na buněčných liniích HeLa (Stollar *et al.*, 1975; Huhtamo *et al.*, 2009), SW-13 (Hobson-Peters *et al.*, 2013; Huhtamo *et al.*, 2014; McLean *et al.*, 2015), HEK293 (Huhtamo *et al.*, 2009; Junglen *et al.*, 2009; Huhtamo *et al.*, 2014).

al., 2014), Hep2 (Junglen *et al.*, 2009; Huhtamo *et al.*, 2014), A549 (Junglen *et al.*, 2009; Evangelista *et al.*, 2013), SH-SY5Y (Huhtamo *et al.*, 2009), MRC-5 (Huhtamo *et al.*, 2014) a na buněčné linii RD (Evangelista *et al.*, 2013).

Ptačí buňky reprezentovala v několika pokusech linie buněk DF-1, která má svůj původ v embryonálních kuřecích fibroblastech (Bolling *et al.*, 2011; Junglen *et al.*, 2009; Kolodziejek *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Kenney *et al.*, 2014; McLean *et al.*, 2015) a v jednom pokusu také blíže nespecifikovaná linie kachních buněk (Lee *et al.*, 2013).

Další obratlovčí buněčné kultury, které se vědci pokoušeli infikovat ISFs, byly odvozeny z buněk drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (Huhtamo *et al.*, 2014; Kenney *et al.*, 2014) a hrozně královského (*Boa constrictor*) (Huhtamo *et al.*, 2014).

Pokusy *in vivo* byly ve všech případech prováděny inokulací viru do novorozených myši (Sang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2009; Evangelista *et al.*, 2013; Haddow *et al.*, 2013; Huhtamo *et al.*, 2014; Carrera *et al.*, 2015; Pukhovskaya *et al.*, 2016).

Přestože byly pokusy o infekci obratlovčích buněk prováděny s mnoha různými druhy specificky hmyzích flavivirů a obsáhly relativně široké spektrum potencionálních hostitelů, žádný z experimentů nevedl k replikaci virů, jak už bylo zmíněno na začátku této kapitoly. To potvrzuje předpoklad, že ISFs nejsou schopné se v obratlovcích množit (Blitvich *et al.*, 2015).

2.7 Experimentální infekce komárů

Experimentální infekce komárů flaviviry specifickými pro hmyz byly prováděny několika vědeckými týmy. Pokusy byly zaměřeny na vertikální přenos ISFs, možnost interference s jiným patogenním flavivirem, tkáňovou specifitu ISFs či na potvrzení dalších hostitelů, než ze kterých byl virus původně izolován.

Ve třech případech se podařilo komáry infikovat intrathorakální injekcí viru (Kent *et al.*, 2010; Saiyasombat *et al.*, 2011; Goenaga *et al.*, 2015), zatímco úspěšná perorální nákaza byla popsána jen v jediné studii (Lutomiah *et al.*, 2007).

Komárům druhu *Cx. quinquefasciatus* byl úspěšně injikován *Culex* flavivirus (kmen Izabal), pokus o perorální infekci však selhal. Nakaženo bylo 100 % jedinců, do kterých byl virus vpraven, a nejvyšších titrů viru bylo dosaženo přibližně 8 dní p. i. (Kent *et al.*, 2010). Stejným postupem byli CxFV nakaženi i komáři *Cx. pipiens* z laboratorního chovu. Titry viru nebyly v tomto pokusu zkoumány, ale prokázala se přítomnost CxFV ve vaječnicích všech naočkovaných samic, a to již 4 dny p. i. (Saiyasombat *et al.*, 2011). Injike viru Nhumirim

(NHUV) rovněž vedla k infekci komárů, a to jak jedinců druhu *Cx. pipiens*, tak *Cx. quinquefasciatus*. Virus byl u nich detekován 3 dny p. i. v homogenátech z těl i ve slinách (Goenaga *et al.*, 2015).

Při intrathorakální injekci je možné infikovat komáry stejným objemem (množstvím viru) a ve všech výše zmíněných studiích měla tato metoda 100% úspěšnost. Nejedná se ovšem o přirozený způsob nákazy a některé závěry (například výskyt viru v určitých tkáních) mohou být zavádějící. Avšak i podle publikace Saiyasombata *et al.* (2011) byl *Culex flavivirus* v jedincích nakažených přirozenou cestou (F1 generace komárů odchycených v přírodě, u kterých byla po vykladení prokázána infekce) nalezen ve všech zkoumaných tkáních (střevo, hlava, tuková tělíska, vaječníky, varlata a slinné žlázy). Je proto možné, že systémová infekce pozorovaná ve výše zmíněných experimentech nebude artefaktem injekce viru. Přesto má tento způsob infekce zřejmě vliv na možný přenos viru. Na rozdíl od přirozeně nakažených komárů nebyly injekčně infikované samice virem CxFV pocházející z dlouhodobě udržované kolonie schopné transovariálního přenosu, a to i přesto, že následný pokus prokázal přítomnost viru ve vaječnicích injikovaných samic. Počet naočkovaných samic z jiné kolonie, které byly schopné infekci CxFV na potomstvo přenést, byl také výrazně nižší, než jaký byl zaznamenán u komárů nakažených přirozenou cestou (Saiyasombat *et al.*, 2011). V případě injekce viru NHUV se úspěšně vylíhl tak malý počet potomků nakažených samic, že nelze v tomto ohledu učinit objektivní závěry (Goenaga *et al.*, 2015).

Tři dny po intrathorakální injekci byl Nhumirim virus u komárů *Cx. pipiens* i *Cx. quinquefasciatus* detekován ve slinách (Goenaga *et al.*, 2015). Naopak po injekci CxFV se virus ve slinách komárů druhu *Culex quinquefasciatus* nevyskytoval (Kent *et al.*, 2010). Zajímavé však je, že při současné injekci CxFV s virem západonilské horečky (WNV) byl *Culex flavivirus* ve slinách injikovaných jedinců přítomen (Kent *et al.*, 2010). Podobný jev, kdy se virus může dostat do určitých buněk pouze za přítomnosti jiného viru, byl již dříve popsán u viru HIV (Human Immunodeficiency Virus). Jedná se pravděpodobně o dosud ne zcela prozkoumaný mechanismus, při kterém se jeden virus přichytí druhého pomocí receptorů na jeho povrchu, a dokáže ho tak využít pro překonání bariéry, kterou by sám překonat nedokázal (Root-Bernstein *et al.*, 1993).

Závěrem z těchto pozorování by mohlo být, že ačkoliv je CxFV schopný nakazit slinné žlázy komárů, množí se v nich jen málo, a není tedy schopen přenosu do slin a následně do obratlovců (Saiyasombat *et al.*, 2011). Dalším vysvětlením může být, že u komárů rodu *Culex* funguje ve slinných žlázách bariéra, která účinně brání šíření CxFV do slin, ale kterou může virus za určitých podmínek obejít, jak bylo popsáno výše (Saiyasombat *et al.*, 2011).

Virus Kamiti river (KRV) byl izolován z komárů druhu *Ae. macintoshi* (Sang *et al.*, 2003). Lutomiah *et al.* (2007) zjišťovali, zda může tento flavivirus nakazit také jedince druhu *Ae. aegypti* z laboratorního chovu, a to perorálně sáním infikované krve. Přestože se tento způsob přenosu pravděpodobně v přírodě nevyskytuje (protože ISFs z definice neinfikují obratlovce), přibližně 60 % plně nasátých samic se úspěšně nakazilo. Přítomnost KRV byla ověřována následnou inokulací na tkáňovou kulturu a při použití citlivější metody imunofluorescence byla zjištěna infekce dokonce u téměř 74 % z těchto jedinců. Možnost perorální nákazy byla ověřována také u larev druhého instaru (L2) *Ae. aegypti*. Larvy se nakazily požitím buněk infikovaných KRV a přítomnost viru byla zkoumána u vylíhnutých dospělců. Přibližně 90 % jich bylo KRV pozitivních (Lutomiah *et al.*, 2007).

Rozdíly v procentech nakažených jedinců, kteří sáli infikovanou krev a dospělců, kteří byli infekci vystaveni ve stadiu L2, si lze vysvětlit jednak tvorbou peritrofické matrix u samic sajících krev (zdá se, že viry, které během několika málo hodin neopustí nasátou krev uzavíranou postupně peritrofickou matrix už nemají šanci komára infikovat (Lutomiah *et al.*, 2007)) a také tím, že samice druhu *Ae. aegypti* mají ve střevě nižší pH než larvy stejného druhu. Je možné, že pH má efekt na viabilitu viru, který preferuje alkaličtější prostředí. Jako třetí hypotézu uvádějí autoři experimentů fakt, že u infekční krve byly přesně známé titry viru, ale v jednotlivých buňkách v rámci kultury, kterou se nakrmily larvy, známé nebyly a mohly být výrazně vyšší než v předchozím případě (Lutomiah *et al.*, 2007).

Ačkoliv se o perorální nákazu příbuznými ISFs pokoušely i další vědecké týmy, infekce komárů nebyly úspěšné (Kent *et al.*, 2010; Aliota *et al.*, 2012).

2.8 Koinfekce ISFs a MBFs

Fenomén virové superinfekce je definován jako děj, při kterém virus vstoupí do buňky již infikované jiným virem. Naopak u několika virů včetně zástupců skupiny *Flaviviridae* byla zjištěna možnost tzv. bloku superinfekce (známého také pod názvem homologní interference, „superinfection exclusion“), při kterém se buňka infikovaná určitým kmenem viru stává rezistentní pro sekundární infekci stejným kmenem. Různé mechanismy homologní interference byly zjištěny v několika stádiích životního cyklu virů – na úrovni ovlivnění buněčných receptorů nutných pro vstup viru do buňky, samotného vstupu viru do buňky i časné replikace (Lee *et al.*, 2005). Předpokládá se, že blok superinfekce napomáhá viru k účinnější infekci napadeného organismu – efektivnějšímu šíření infekce i množení viru a uchování genetické diverzity v populaci viru (Lee *et al.*, 2005). U některých flavivirů bylo

zjištěno, že blok superinfekce zahrnuje nejen sekundární infekci stejným druhem viru, ale také příbuznými viry. Zdá se, že blok superinfekce mezi různými druhy flavivirů je tím účinnější, čím jsou si druhy navzájem příbuznější (Zou *et al.*, 2009).

Potencionálně by ISFs mohly právě tímto způsobem bránit přenosu závažných onemocnění. Vzhledem k jejich celosvětovému rozšíření v širokém spektru hostitelských druhů komárů by jejich vliv na snížení schopnosti replikace flavivirů patogenních pro obratlovce mohl nabídnout nové metody prevence přenosu původců život ohrožujících chorob. K dnešnímu dni však existuje jen několik málo studií, které se zaměřily na koinfekce medicínsky významných flavivirů s flaviviry specifickými pro hmyz, a jejich výsledky si v mnohém protiřečí (Kent *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2011; Tyler *et al.*, 2011; Bolling *et al.*, 2012; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Kenney *et al.*, 2014; Goenaga *et al.*, 2015; Kuwata *et al.*, 2015b).

2.8.1 Pokusy *in vitro*

Pokusy *in vitro* byly ve většině případů prováděny na kulturách komářích buněk C6/36. Dva z pěti dosud publikovaných experimentů prověřovaly možnost superinfekce buněk již nakažených druhem *Culex* Flavivirus (CxFV) virem západonilské horečky (WNV). Podle jednoho z výzkumů se interference mezi oběma flaviviry projevuje pouze v počáteční fázi sekundární infekce, později již nemá předchozí infekce CxFV na množení WNV vliv (Bolling *et al.*, 2012). Výsledky druhého výzkumu naopak ukázaly, že namnožení WNV v kultuře buněk C6/36 nebylo inhibováno předcházející infekcí CxFV (Kent *et al.*, 2010). Rozpor mezi oběma zaznamenanými výsledky může být způsoben použitím rozdílných izolátů virů CxFV i WNV z různých geografických oblastí (Colorado vs. Guatemala), získaných z odlišných druhů komárů (WNV z *Cx. tarsalis* vs. *Cx. quinquefasciatus*, CxFV z laboratorního chovu *Cx. pipiens* vs. kmen CxFV Izabal z volně žijících *Cx. quinquefasciatus*) a s odlišným počtem pasáží izolátů virů na buněčných kulturách (Kent *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2012).

Protože buňky C6/36 jsou získány z komárů druhu *Ae. albopictus*, který není přirozeným hostitelem CxFV (alespoň doposud u něj nebyl tento virus detekován), byly provedeny pokusy také na buňkách pocházejících z embryí komárů *Cx. tritaeniorhynchus* (NIID-CTR cells), které byly dlouhodobě infikovány CxFV. V těchto experimentech nebyl nalezen žádný důkaz bloku superinfekce při sekundárních infekcích virem dengue ani virem Japonské encefalitidy (Kuwata *et al.*, 2015b).

Další studie *in vitro* zkoumala vliv primární infekce buněk C6/36 druhem Palm Creek virus (PCV) na následné infekce viry encefalitidy údolí Murray (Murray Valley encephalitis virus, MVEV) a západonilské horečky (Kunjin virus – WNV_{KUNV}). Autoři na základě získaných výsledků předpokládají, že komáří buňky trvale infikované PCV jsou méně vnímavé pro následnou infekci WNV_{KUNV} a MVEV minimálně po dobu 48 hodin od sekundární inokulace, a to díky bloku superinfekce (Hobson-Peters *et al.*, 2013).

V roce 2014 byl publikován článek o viru Nhumirim (NHUV), který působil signifikantní snížení produkce flavivirů WNV, viru St. Louis encefalitidy (SLEV) i viru Japonské encefalitidy (JEV) v koinfikovaných buňkách C6/36 (Kenney *et al.*, 2014). Inhibice množení WNV a SLEV byla o něco účinnější než u JEV, nicméně výrazné snížení produkce všech tří medicínsky významných flavivirů bylo pozorováno nejen v počáteční fázi infekce (jako u výše zmíněných experimentů), ale i sedmý den po inokulaci (Kenney *et al.*, 2014). Experiment byl později zopakován s NHUV a WNV nejen v buňkách C6/36, ale také v kulturách jiné buněčné linie z komárů *Ae. albopictus*, C7/10. V obou buněčných liniích vedla koinfekce WNV s NHUV k výraznému snížení množství viru západonilské horečky oproti kontrolním kulturám infikovaným pouze WNV, a to opět i sedmý den po inokulaci, čímž se výsledky úvodní studie potvrdily (Goenaga *et al.*, 2015).

Není zcela jasné, zda se tento pozorovaný děj dá považovat za blok superinfekce, protože podobných výsledků bylo dosaženo nejen při sekundární infekci buněk, které již byly infikovány NHUV, ale také při současné inokulaci viru Nhumirim a druhého flaviviru (WNV, SLEV, JEV) (Kenney *et al.*, 2014; Goenaga *et al.*, 2015). Nhumirim virus by mohl mít vlastní (dosud nepopsaný) mechanismus, kterým brání replikaci (alespoň některých) MBFs (Kenney *et al.*, 2014; Goenaga *et al.*, 2015). Na tomto místě je důležité zmínit, že virus Nhumirim je více příbuzný dvouhostitelským komáry přenášeným flavivirům (spadá mezi tzv. dual-host affiliated ISFs) než virům Palm Creek a Culex flavivirus (více viz kapitola 2.3), a proto se mechanismy, které brání superinfekci, mohou lišit (Kenney *et al.*, 2014; Goenaga *et al.*, 2015).

Z výše uvedeného vyplývá, že výsledky *in vitro* pokusů nejsou jednoznačné, i když fenomén bloku superinfekce byl zaznamenán opakovaně a u viru Nhumirim byla dokonce zaznamenána vysoká účinnost v omezení replikace flavivirů z komplexu virů Japonské encefalitidy. Ovšem pokusy na buněčných kulturách se mohou výrazně lišit od pokusů *in vivo*, a to především kvůli omezené imunitní odpovědi nejčastěji používané linie buněk C6/36 (Brackney *et al.*, 2010) a obecně kvůli tomu, že buněčné kultury postrádají systémovou imunitní odpověď, jakou lze najít u komplexních organismů. Ze srovnání publikovaných dat

lze navíc vyvodit, že jednotlivé kmeny či izoláty stejného druhu viru se mohou lišit svým vlivem na superinfekci, a to v identických podmínkách.

2.8.2 Pokusy *in vivo*

Existují i experimentální infekce komárů z laboratorních chovů virem západonilské horečky po předchozí inokulaci virem *Culex flavivirus*. Výsledky dosud jediných dvou publikovaných pokusů si však vzájemně odporují. Zatímco jedna skupina autorů zjistila, že přítomnost CxFV potlačuje replikaci WNV v prvních dnech po sekundární infekci, a tím se prodlužuje inkubační doba WNV ve vektorech koinfikovaných CxFV (Bolling *et al.*, 2012), závěrem druhé studie je naopak posilující vliv primární infekce CxFV na výši titrů následně inokulovaného WNV ve stejném období (Kent *et al.*, 2010). Autoři obou výzkumů se však shodují v tom, že později (cca 10 dnů p. i.) už předchozí přítomnost CxFV nemá na diseminaci, infektivitu ani míru přenosu WNV žádný vliv.

Na protichůdnost zjištěných faktů mají pravděpodobně zásadní vliv výchozí podmínky experimentů. Ty byly prováděny opět s různými izoláty virů a navíc u kolonií odlišných druhů komárů rodu *Culex*. V jednom případě byly porovnávány dvě kolonie komárů *Cx. pipiens* pocházející ze vzájemně vzdálených geografických lokalit, z nichž u jedné byla zjištěna dlouhodobě udržovaná nákaza CxFV (získaná pravděpodobně už při zakládání chovu), zatímco jedinci z druhé kolonie v sobě žádnou flavivirovou RNA neměli (Bolling *et al.*, 2012). Ve druhém experimentu měli autoři k dispozici dvě kolonie druhu *Cx. quinquefasciatus* pocházející rovněž z odlišných lokalit. V rámci obou kolonií vytvořili skupiny, kterým intrathorakálně injikovali infekce schopný či naopak tepelně inaktivovaný CxFV a následně (po několika dnech) je perorálně nakazili virem západonilské horečky (Kent *et al.*, 2010).

Zajímavostí je, že v druhé zmíněné studii vyšly odlišné výsledky u obou porovnávaných kolonií, mezi kterými byl rozdíl „pouze“ v jejich geografickém původu – důvodem je pravděpodobně odlišná prostupnost slinných žláz pro šíření viru (Kent *et al.*, 2010). Toto zjištění částečně zpochybňuje závěry první zmíněné studie, kde se porovnávané skupiny komárů lišily nejen v tom, zda byly nakažené CxFV, ale také svým geografickým původem (viz výše). Sami autoři však přiznávají, že pozorované rozdíly mohou být artefaktem malého počtu jedinců zkoumaných v jednotlivých dnech po infekci (Kent *et al.*, 2010). Je také důležité zmínit, že intrathorakální injekce viru není přirozeným způsobem nákazy, což může mít na získané informace zásadní vliv a částečně vysvětlovat rozdíly mezi

oběma zmíněnými studiemi.

Vliv primární infekce virem *Culex flavivirus* na vektorovou kompetenci komárů pro WNV nebyl dosud přesvědčivě objasněn. Aby mohl blok superinfekce omezit množení příbuzného flaviviru, musely by oba viry napadat stejné buňky v těle komára, ovšem o tkáňové preferenci ISFs toho není mnoho známo. Je také prokázáno, že dlouhodobý chov snižuje genetickou diverzitu populace a může ovlivnit její fitness, takže vektorová kompetence komárů z laboratorního chovu se může lišit od volně žijících populací (Bolling *et al.*, 2012).

Nhumirim virus (NHUV) patří na rozdíl od CxFV mezi dISFs a jeho potvrzeným přirozeným hostitelem je *Culex chidesteri* (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2014). Také u NHUV byl zkoumán jeho vliv na přenos WNV u komárů *Cx. pipiens* a *Cx. quinquefasciatus*. U druhu *Cx. pipiens* se během 14 dní po současné intrathorakální injekci WNV a NHUV nelišily titry WNV ani šíření tohoto viru v organismu v porovnání se skupinou, které byl injikován pouze virus západonilské horečky (Goenaga *et al.*, 2015). V případě druhu *Cx. quinquefasciatus* se počet komárů, u kterých byla zjištěna infekce WNV, lišil třetí den po infekci. Současná inokulace NHUV a WNV vedla k detekci viru západonilské horečky u 91 % injikovaných jedinců oproti 100 % pozorovaným u skupiny, které byl naočkován pouze WNV. U koinfikovaných jedinců byly zároveň zjištěny nižší titry WNV ve srovnání s kontrolní skupinou. V následujících dnech (5, 7 a 9 d. p. i.) se však již rozdíly nevyskytovaly a nákaza WNV byla potvrzena u všech jedinců z obou skupin s tím, že ani titry WNV se signifikantně nelišily (Goenaga *et al.*, 2015). Přesto bylo prokázáno, že koinfekce WNV a viru Nhumirim vedla ke snížení počtu komárů *Cx. quinquefasciatus*, kteří byly schopni přenášet virus západonilské horečky. Signifikantní rozdíly v míře přenosu se projevíly sedmý (~30 % oproti ~70 %) a devátý (~24 % oproti ~67 %) den po infekci (Goenaga *et al.*, 2015).

Ani informace získané z terénních odchytů nedávají na otázku důsledků koinfekce flavivirů specifických pro hmyz s MBFs jednoznačnou odpověď. V Chicagu byla zjištěna pozitivní asociace mezi přítomností viru *Culex flavivirus* a virem západonilské horečky v komárech rodu *Culex* (Newman *et al.*, 2011) a podobné výsledky (pro Calbertado virus a WNV) potvrdilo i testování komárů *Cx. tarsalis* z Manitoby (Tyler *et al.*, 2011). Výzkum na jihovýchodě USA, během kterého byli odchytáváni jedinci druhu *Cx. quinquefasciatus* (Crockett *et al.*, 2012), ani data získaná z odchytu komárů *Cx. tarsalis* z Kalifornie (Tyler *et al.*, 2011) však žádnou takovou asociaci nepotvrdily.

Potencionální role flavivirů specifických pro hmyz v potlačení či napomáhání přenosu medicínsky důležitých flavivirů není stále dostatečně prozkoumána a mnozí autoři poukazují

na nutnost zjistit o této problematice více informací (Bolling *et al.*, 2012; Calzoari *et al.*, 2015; Carrera *et al.*, 2015). Výsledky pokusů s virem Nhumirim však napovídají, že alespoň některé ISFs působí u určitých druhů komárů snížení schopnosti přenosu flavivirů, které jsou původci závažných onemocnění obratlovců (Goenaga *et al.*, 2015).

2.9 Vertikální a horizontální přenos ISFs

2.9.1 Vertikální přenos

Vertikální přenos, při kterém infikovaná samice přenáší patogeny na své potomky, je pravděpodobně hlavním způsobem, jakým se ISFs udržují v populacích svých hostitelů (Bolling *et al.*, 2012; Blitvich *et al.*, 2015; Calzoari *et al.*, 2015). Jednou z cest vertikálního přenosu je přenos transovariální (transovarial transmission, TOT), při kterém je potomstvo nakažené samice infikováno už ve stadiu vajíčka v ovariích, tedy před uvolněním a následnou inseminací.

O vertikálním přenosu se ve spojitosti s viry specifickými pro hmyz uvažovalo už od doby objevu těchto virů, protože první ISFs byly nalezeny u nedospělých stádií komárů, což tomuto způsobu přenosu nasvědčuje. Cell fusing agent byl izolován z buněk, které byly získány z larev komára *Ae. albopictus* (Stollar *et al.*, 1975) a první ISF izolovaný z volně žijící populace komárů (Kamiti River virus) byl také původně detekován u jedinců, kteří byli odchyceni ve stádiích larev a kukel (Sang *et al.*, 2003). Výskyt dalších ISFs u jedinců obou pohlaví a ve všech životních stádiích včetně vajíček vertikálnímu přenosu také nasvědčuje (Hoshino *et al.*, 2007; Farfan-Ale *et al.*, 2009; Bolling *et al.*, 2011; Saiyasombat *et al.*, 2011; Haddow *et al.*, 2013; Bolling *et al.*, 2015a; Misencik *et al.*, 2016).

Experimentálně bylo ověřeno, že komáři přirozeně nakažení *Culex* flavivirem (CxFV) jej transovariálně přenášejí na své potomstvo a míra přenosu dosahuje 70 – 100 % (Bolling *et al.*, 2012). Vertikální přenos viru Nhumirim byl v laboratorních podmínkách rovněž prokázán (Goenaga *et al.*, 2015). Jedná se tedy o způsob, jakým se virus může efektivně dlouhodobě udržovat v hostitelských populacích (Bolling *et al.*, 2011; Saiyasombat *et al.*, 2011; Bolling *et al.*, 2012).

Avšak v experimentální studii samice druhu *Cx. pipiens*, kterým byl CxFV injikován, virus na své potomstvo přenášely v mnohem menší míře, než je uvedeno výše, nebo dokonce nebyly přenosu schopné vůbec (Saiyasombat *et al.*, 2011). Autoři experimentu diskutují možnost, zda laboratorní chov nemůže u komárů pozměnit některé vlastnosti umožňující TOT. U samic z kolonie, která měla trvání pouze čtyři generace, byla zjištěna míra přenosu

kolem 20 %, zatímco samice z kolonie udržované v laboratorních podmínkách dlouhodobě virus na potomstvo nepřenášely vůbec (Saiyasombat *et al.*, 2011). Další možností je, že rozdíl v míře přenosu je artefaktem injekce viru, jak už bylo zmíněno v kapitole o experimentálních infekcích komárů. Tuto hypotézu doplňují autoři úvahou o tom, že dlouhodobá nákaza (přenesená na potomky od rodičů) může potencionálně způsobovat patologické změny ve vaječnících, které transovariální přenos usnadňují (Saiyasombat *et al.*, 2011). Při jiném experimentu, ve kterém byly samice *Ae. aegypti* infikovány perorálně virem Kamiti River (KRV), se virus přenesl pouze na přibližně 4 % jejich potomků (Lutomiah *et al.*, 2007). Omezená míra přenosu může být v tomto případě dána tím, že *Ae. aegypti* není potvrzeným přirozeným hostitelem KRV (Blitvich *et Firth*, 2015), ačkoli v úvahu pochopitelně připadají i hypotézy zmíněné výše.

Vertikální přenos byl u různých druhů ISFs prokázán opakovaně, a je tedy rozhodně jedním ze způsobů, kterými jsou viry specifické pro hmyz udržovány v hostitelských populacích. K přenosu ISFs však zřejmě dochází i jinými cestami, jak naznačuje zejména výskyt stejných virů u několika různých druhů komárů (Moureau *et al.*, 2015). Navíc, pokud by se ISFs přenášely pouze vertikálně, dala by se očekávat jejich velice vysoká prevalence v rámci jednotlivých populací, což však neodpovídá pozorovaným skutečnostem (Bolling *et al.*, 2011). Rozdíly v počtu nakažených samců (~40 %) a samic (~85 %) v laboratorní kolonii trvale infikované *Aedes flavivirem* (AeFV) také naznačují, že vertikální přenos, u kterého by se dal předpokládat obdobný podíl nakažených jedinců obou pohlaví, není jediným způsobem, jak se zde virus udržuje (Bolling *et al.*, 2015a). U některých flavivirů specifických pro hmyz (AeFV, CxFV, CLBOV) byla navíc zaznamenána sezónní dynamika výskytu (Blitvich *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Calzoari *et al.*, 2010a; Bolling *et al.*, 2011), která rovněž napovídá, že vertikální přenos nemůže být jediným způsobem, jak se ISFs přirozeně udržují a šíří v populacích svých hostitelů. V takovém případě by totiž k výrazným prevalenčním změnám v dlouhodobě sledovaných populacích docházet nemělo (Blitvich *et Firth*, 2015).

2.9.2 Horizontální přenos

Většina známých flavivirů je přenášena horizontálně, a to mezi krevsajícími členovci a obratlovčími hostiteli. Takový přenos může být biologický (virus se ve vektorovi množí) či mechanický, jak bylo zaznamenáno u jiných skupin arbovirů (Mellor, 2000). Žádný z dosud objevených ISFs nebyl schopen infikovat zkoumané obratlovčí buňky (viz kapitola 2.6).

Experimentální nákaza komárů sáním krve obsahující Kamiti River Virus však byla úspěšná (Lutomiah *et al.*, 2007) a opakovaně byl prokázán také výskyt různých ISFs ve slinných žlázách infikovaných komárů (Saiyasombat *et al.*, 2011; Kent *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2015a; Goenaga *et al.*, 2015).

Dalším způsobem horizontálního přenosu virů je přenos pohlavní, který se podařilo prokázat při experimentech s CxFV, a to z infikovaných samců na neinfikované samice i naopak. Tímto způsobem bylo nakaženo pouze malé množství jedinců (2 – 5 %) a nezdá se tedy, že by pohlavní přenos hrál v šíření ISFs významnější roli (Bolling *et al.*, 2012).

Je známo, že různé druhy komárů využívají stejná místa ke kladení vajec a současný výskyt jejich larev v takovém prostředí (horizontální kontaktní přenos) je jedním z možných teoretických vysvětlení detekce stejných virů u různých hostitelských druhů (Moureau *et al.*, 2015). Kontaktní přenos však nebyl při pokusech s CxFV pozorován ani u larev ani u dospělců komárů *Cx. pipiens* (Bolling *et al.*, 2012). Bylo ale prokázáno, že larvy *Ae. aegypti* se mohou nakazit pozřením komářích buněk infikovaných KRV (Lutomiah *et al.*, 2007). Tímto způsobem by se tedy hypoteticky mohly skutečně na jedné lokalitě nezávisle na sobě nakazit larvy různých druhů komárů stejným druhem viru.

Moureau *et al.* (2015) diskutuje také možné zapojení samic entomofágních zástupců čeledi Ceratopogonidae do přenosu virů mezi komáry. Ty by podle něj mohly umožnit kolování patogenů parazitací na nasátých samicích komárů – po nabodnutí jejich abdomenu jsou schopny sát krev, kterou obsahuje střevo komárů (Laird, 1946; Chhilar *et al.*, 2010). Tímto způsobem by se z nich teoreticky mohli stát vektoři ISFs, kteří viry přenášejí mezi různými druhy komárů (Moureau *et al.*, 2015).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Odchyt a druhová determinace komárů

3.1.1 Odchyt komárů

Pro odchty komárů jsem využívala pasti CDC mini light traps (Center for Disease Control and Prevention) a jako atraktant pro komáry sloužil oxid uhličitý. V některých případech probíhal sběr komárů také entomologickou sítí, a to jak smykem z vegetace, tak i odchtem naletujících samic. Doplnkovou metodou pak byl sběr sedících samic exhaustorem.

Použité pomůcky pro odchyt do pastí:

- CDC pasti bez světelného zdroje (John W. Hock, USA), typ 512 a 1012
- baterie (HAZE, HZS 6 – 12, 6V, 12Ah)
- termosky s vývodem
- CO₂ ve formě suchého ledu, kostky nebo pelety (Linde Gas)
- polystyrenové krabice na uchování suchého ledu a vzorků
- plastové Petriho misky
- entomologická pinzeta

Použité pomůcky pro sběr entomologickou sítí a exhaustorem:

- entomologická sítka
- exhaustor
- nylonová sítka s železnou konstrukcí pro převoz živých komárů

Odchyty pomocí CDC pastí byly prováděny v letech 2013 – 2015 v Národní přírodní rezervaci (NPR) Řežabinec a Řežabinecké tůně (v rámci schváleného dlouhodobého výzkumu této lokality) v jižních Čechách a v roce 2013 také v údolí potoka Zábrdky na pomezí Středočeského a Libereckého kraje. Odchyty entomologickou sítí probíhaly v údolí Zábrdky a také v Polabí v okolí obce Byšičky (viz obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Místa odchyťů komárů v letech 2013 – 2015

Na území NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň probíhaly odchyty v letech 2013 – 2015, vždy na přelomu července a srpna, a to intenzivně během osmi až devíti po sobě následujících nocí. CDC pasti bez světelného zdroje byly instalovány na třech typech míst – na březích rybníka hustě zarostlých rákosem (obr. č. 4), nad vodní hladinou tůň a na jejich březích (obr. č. 5) a v přilehlých sušších místech se stromy a křovinami (obr. č. 6). V údolí Zábrdky probíhal odchyt pomocí CDC pastí pouze v roce 2013, a to intenzivně během tří následujících nocí. Pasti zde byly umístěny do zarostlých míst, kam se potok pravidelně rozlévá a zanechává zde dlouhodobě zatopená místa (např. bývalý náhon rozpadlého vodního mlýna). Pro nalákání komárů byl ve všech případech používán oxid uhličitý ve formě suchého ledu. Pasti byly zavěšeny na příhodné větve stromů či křovisek do výšky cca 1,5 m a v jejich blízkosti byly umístěny také termosky se suchým ledem. Hadičkou se pak uvolňující se oxid uhličitý dostával k hornímu okraji pastí.



Obrázek č. 4: Ukázka umístění CDC pasti v porostu rákosí (NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň)



Obrázek č. 5: Ukázka umístění CDC pasti na břehu tůně (NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň)



Obrázek č. 6: Ukázka umístění CDC pasti v lesíku (NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň)

Pasti byly spouštěny večer (kolem osmnácté až devatenácté hodiny), tedy v době, kdy letní vysoké denní teploty začaly pozvolna klesat, a sítě s odchycenými komáry byly z pastí odebírány mezi sedmou a osmou hodinou ránní; před tím, než začaly teploty opět výrazně stoupat. Odchyty tak probíhaly večer, kdy je aktivita komárů nejvyšší, dále během celé noci a také během zvýšené aktivity komárů v ranních hodinách. Odebrané odchytové sítě byly následně umístěny do polystyrenových krabic se zásobním suchým ledem a pomocí CO₂, který se zde uvolňoval, a částečně také zmražením při kontaktu s kostkami suchého ledu, byli odchycení komáři usmrceni. Po přemístění do Petriho misek (s označením data a místa či konkrétní pasti odchyty) zde byli komáři také v terénu uskladnění (suchý led zajišťuje teplotu okolo –70 °C). Po převozu do laboratoře byli odchycení jedinci dále uchovávaní v –70 °C. Nízká teplota pod bodem mrazu byla zvolena proto, aby nedošlo k destrukci potencionálně přítomných virových částic či jejich genetické informace (RNA).

V případě odchytů entomologickou sítí a sběru sedících samic exhaustorem byli živí komáři v terénu přemístěni do nylonové sítě vypnuté v kovové konstrukci (tyto sítě se používají rovněž pro dlouhodobý chov hmyzu) a až do převozu do laboratoře jim zde byla pomocí navlhčené vaty udržována optimální vlhkost. V případě, že zde byli odchycení komáři přechovávaní déle než jeden den, byla přidána rovněž cukerná potrava (50% cukerný roztok). V laboratoři byli komáři usmrceni zmražením v –70 °C.

3.1.2 Druhová determinace odchycených komárů

Použité pomůcky:

- plastové Petriho misky
- měkká entomologická pinzeta
- plastové minizkumavky Eppendorf 1,5 ml
- binokulární lupa (SZX12, Olympus Optica, Inc.)

S využitím binokulární lupy byli komáři na základě morfologických znaků určeni do druhů dle klíče Fauna ČSR, svazek 13, Komáři bodaví (Kramář 1958). Během určování bylo nutné jedince stále udržovat na ledu, aby nedošlo k jejich úplnému rozmražení. Z tohoto důvodu byli také v některých případech komáři určováni pouze na úroveň komplexu druhů dle zmíněného klíče (Kramář, 1958): komplex *Aedes cantans* zahrnuje druhy *Ae. cantans*, *Ae. riparius*, *Ae. annulipes*, *Ae. excrucians* a *Ae. flavescens*. Do skupiny *Aedes communis-rusticus* se řadí druhy *Ae. communis*, *Ae. punctor*, *Ae. leucomelas*, *Ae. cataphylla*, *Ae. sticticus*, *Ae.*

nigrinus, *Ae. pullatus*., *Ae. diantaeus*, *Ae. intrudens*, *Ae. rusticus* a *Ae. refiki*. *Culex pipiens* komplex pak tvoří druhy *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium*. Roztřídění jedinci byli následně rozděleni do plastových zkumavek (Eppendorf) o objemu 1,5 ml. Počet jedinců ve vzorku se pohyboval v rozmezí 1 – 12, naprostá většina vzorků však obsahovala přesně deset komárů. Před dalším zpracováním byly vzorky opět uloženy do -70 °C. V následujícím kroku bylo do zkumavek postupně přidáno 600 µl PBS (1× koncentrovaný) a 30 µl teplotně inaktivovaného FBS. Takto vytvořená směs byla přímo v minizkumavce zhomogenizována pomocí autoklávovaných umělohmotných homogenizačních pístů. Vzorky byly i během homogenizace udržovány na ledu. Po centrifugaci (cca 15 sekund/8 000 RPM) bylo 140 µl odebraného supernatantu použito na izolaci RNA, zbytek homogenátu byl rozdělen na dvě části (240 a 250 µl) a ponechán pro další účely v -70 °C.

3.1.3 Izolace DNA a specifická amplifikace pro rozlišení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium*

Použité pomůcky a chemikálie:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa)
- specifické primery (viz níže)

Z homogenátů vzorků obsahujících po deseti jedincích určených jako *Culex pipiens* komplex byla izolována celková DNA dle pokynů výrobce komerčního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Pouze v posledním kroku celého procesu byla DNA z kolonky eluována do 100 µl PCR vody namísto elučního pufru, a to na základě zkušeností ostatních kolegů z naší laboratoře (laboratoř Biologie hmyzích vektorů a jimi přenášených patogenů, Katedra parazitologie PřF UK).

Izolovaná DNA byla dále použita na standardní PCR se specifickými primery pro rozlišení druhů *Culex pipiens* a *Cx. torrentium*. Tyto primery jsou zaměřeny na úsek jednoho z genů, který kóduje acetylcholinesterázu (ACE), ve kterém jsou výše zmíněné druhy polymorfni (Smith *et* Fonseca, 2004).

Tabulka č. 2: Specifické primery pro rozlišení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium*

název primeru	orientace	sekvence primeru (5'→3')
ACEpip	forward	GGAAACAACGACGTATGTACT
ACEtorr	forward	TGCCTGTGCTACCAGTGATGTT
B1246S	reverse	TGGAGCCTCCTCTTCACGGC

Tabulka č. 3: Složení amplifikační reakce *Cx. pipiens* vs. *Cx. torrentium* (celkový objem 24 µl)

Master Mix (2× koncentrovaný)	12 µl
PCR H ₂ O	8 µl
primer ACEpip (0,1 µM)	1 µl
primer ACEtorr (0,1 µM)	1 µl
primer B1246S (0,2 µM)	1 µl
vzorek DNA	1 µl

Tabulka č. 4: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (ACEpip/ACEtorr/B1246S)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	94 °C	5 min
35×	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	1 min
1×	72 °C	5 min

Přítomnost a velikost specifických ampliconů byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy (1% agarózový gel, 1× TAE pufr), viz také kapitola 3.2.5. Produkty potvrzující přítomnost *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium* se liší velikostí (610 bp a 416 bp). Výsledky (přítomnost jednoho či dvou pruhů) byly proto zřejmé již z fotografie gelu a nebylo nutné pro jejich ověření izolovat a sekvenovat PCR produkty.

Chemikálie použité pro horizontální elektroforézu:

- TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica)
- Agaróza (Invitrogen Ltd.)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)

Původně jsem pro získání templátové DNA k rozlišení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium* zkoušela i alternativní metody – přímou PCR z končetin jednotlivých komárů (Werblow *et al.*, 2016) i metodu extrakce DNA z končetin jednotlivých komárů pomocí

sonikace (Hunter *et al.*, 2008). Cílem bylo izolovat DNA z jednotlivců, nikoli ze vzorků obsahujících více komárů. Zároveň jsem však chtěla dosáhnout toho, aby z jedinců použitých na izolaci DNA bylo možné izolovat také RNA a detekovat případně přítomné flaviviry. Vzhledem k tomu, že zmíněné metody měly jen částečnou úspěšnost, přistoupila jsem nakonec ke klasické izolaci DNA (viz výše). Použity byly homogenáty ze vzorků obsahujících deset komárů, ze kterých bylo již dříve odebráno potřebné množství materiálu na izolaci virové RNA.

3.2 Detekce flavivirové RNA

3.2.1 Izolace RNA

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- QIAamp® Viral Mini Kit (QUIAGEN)
- 96% etanol (Sigma-Aldrich)

Izolace virové RNA z homogenizovaných vzorků (viz výše) byla provedena komerčním kitem QIAamp® Viral Mini Kit dle protokolu. Část takto získané RNA byla použita na přepis do cDNA (viz níže), zbytek byl uchován v – 70 °C.

3.2.2 Přechištění DNázou

V úvodních pokusech jsme se rozhodli zjistit, zda se ve vzorcích, které budeme používat na PCR (cDNA odpovídající izolované RNA, viz kapitola 3.2.3), objevuje také DNA komárů, která je schopna amplifikace. Za použití primerů pro CO-I barcoding (LCO/HCO) jsme prokázali, že DNA komárů je přítomna a mohla by vést ke kontaminacím a falešně pozitivním výsledkům. U dalších vzorků jsme se proto rozhodli přidat krok přechištění izolované RNA deoxyribonukleázou (DNázou).

Tabulka č. 5: Primery použité pro CO-I barcoding – ověření přítomnosti hostitelské DNA v izolované virové RNA

název primeru	orientace	sekvence primeru (5'→3')
LCO1490*	forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198*	reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

*Folmer *et al.*, 1994

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- DNase I (Thermo Scientific)
- Buffer DNase I (Thermo Scientific)
- EDTA (50 mM, Thermo Scientific)
- PCR H₂O (Top-Bio)

Tabulka č. 6: Složení úvodní směsi pro přečištění vzorků DNázou

RNA ze vzorku	5 µl
Pufr DNase I	1 µl
DNase I	1 µl
PCR H ₂ O	3 µl

Směs vytvořená dle tabulky č. 6 byla v 1,5 ml zkumavkách (Eppendorf) inkubována po dobu 30 minut při 37 °C. Poté k ní byl přidán 1 µl EDTA a následovala inkubace 10 minut při teplotě 65 °C.

3.2.3 Přepis RNA do cDNA

Celkem 10 µl přečištěné izolované RNA bylo v dalším kroku přepsáno do komplementární DNA (cDNA) pomocí komerčního kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). V úvodním kroku byly ke vzorku přidány 2 µl Random Hexamers (výrobce zde nabízí dvě alternativy) a dále jsem postupovala dle pokynů k použití kitu. Ze získané cDNA (20 µl) byla část použita na PCR pro základní detekci flavivirů a zbytek byl uchován v – 20 °C pro případné opakování či PCR s jinými primery.

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)

3.2.4 Specifická polymerázová řetězová reakce (PCR)

Složky reakční směsi pro PCR reakce:

- Templátová DNA
- Specifické primery (viz dále)
- PPP Master Mix (Top-Bio) nebo EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa)
- PCR H₂O (Top-Bio)

Vzhledem k tomu, že klasické metody pro průkaz arbovirů z komárů (intracerebrální inokulace vzorků do myši či izolace v buněčných kulturách) jsou časově náročné a nákladné, zaměřila se řada předchozích studií na nové metody detekce virů založené na principu PCR s použitím univerzálních čeledově specifických primerů. Pro čeleď *Flaviviridae* bylo navrženo několik takových primerů. My jsme se rozhodli pro základní detekci flavivirů u odchycených komárů využít primery, které jsou zacílené na konzervovaný úsek genu pro nestrukturní protein 5 (NS5) dle publikace Scaramozzino *et al.*, 2001. Tyto primery rovněž doporučuje metodická publikace Gelbič *et al.*, 2012.

Tabulka č. 7: Univerzální primery využitě pro základní detekci flavivirů

název primeru	orientace	sekvence primeru (5'→3')
MAMD	forward	AACATGATGAARAGRGARAA
CFD2	reverse	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC

Tabulka č. 8: Složení amplifikační reakce pro kombinaci primerů MAMD/CFD2

Master Mix (2× koncentrovaný)	11 µl
PCR H ₂ O	9 µl
primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl
primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl
vzorek cDNA	1 µl

Tabulka č. 9: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (MAMD/CFD2)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	94 °C	3 min
35×	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	45 s
1×	72 °C	5 min

Primery MAMD a CFD2 amplifikují produkt o velikosti ~250 párů bází. Vyzkoušeli jsme proto ještě další navrhnuté univerzální flavivirové primery (PF1S a PF2R) zacílené na stejný konzervovaný úsek genu pro NS5, které měly amplifikovat produkt o něco větší, okolo 270 bp (Crochu *et al.*, 2004; Moureau *et al.*, 2007). Ty však fungovaly méně spolehlivě (ne všechny pozitivní kontroly se s nimi podařilo amplifikovat) a při úspěšné amplifikaci se nám podařilo získat sekvence jen ~170 nukleotidů. Obdobné výsledky přinesly i obměny v sekvencích primerů dle publikace Moureau *et al.*, 2007 a na základě osobní konzultace s Laurence Bichaud, PhD. (Aix-Marseille Université, Unité de Recherche d'Emergence des Pathologies Virales). Pozměněné (PF3S a PF2Rbis) i původní primery byly určeny pro kvantitativní PCR (q-PCR). Ani při využití metody q-PCR nám však výsledky u všech kontrol nevyšly pozitivní. Dále jsem proto s těmito primery nepracovala.

Tabulka č. 10: Alternativní univerzální flavivirové primery zacílené na úsek genu pro NS5

název primeru	orientace	sekvence primeru (5'→3')
PF1S	forward	TGYRTBTAYAACATGATGGG
PF2R	reverse	GTGTCCCADCCDGC DGTRTC
PF3S	forward	ATHTGGTWYATGTGGYTDGG
PF2Rbis	reverse	GTGTCCCA ICCNGCNGTRTC

Pro rozšíření získaných sekvencí jsme zkusili PCR s dalšími univerzálními flavivirovými primery zaměřenými na gen pro obalový protein (Gaunt *et al.*, 2005) a sadu primerů navrhnutých pro druh *Culex theileri* flavivirus (Parreira *et al.*, 2012), který se na základě předběžných analýz zdál mnoha námi získaným sekvencím nejpodobnější (viz kapitola 4.2.1.1).

Tabulka č. 11: Přehled primerů použitých pro získání dalších sekvencí detekovaných flavivirů

název	pozice nukleotidů v genomu flavivirů	orientace	sekvence primeru (5'→3')
Uni for ¹	303-326	forward	TGGGGNAAYSRNTGYGGNYTNTTYGG
Uni rev ¹	1323-1324	reverse	CCNCCHRNNGANCCRAARTCCCA
Uni2 for I ¹	329-354	forward	ARGGBAGYATHGTDRSNTGYRYMAAG
Uni2 for II ¹	331-356	forward	GGRDRMDTBKWSAYVTGYGCNAWRTT
Uni2 rev I ¹	1236-1259	reverse	CCRATRSWRCTVCCYDKYTGRAACCA
Uni2 rev II ¹	1236-1259	reverse	CCNATNSWRCTHCCHKHYTRWRCCA
F16 ²	1-27	forward	AGTTTTTAAAACTTYRGCTTGTTAM

název	pozice nukleotidů v genomu flavivirů	orientace	sekvence primeru (5'→3')
SeqF ²	719-739	forward	CGCTACCATCGCTGTCTTCCG
SeqG ²	1647-1667	reverse	GTGTAGCGATCGCGTCATCCC
F13 ²	2219-2241	forward	GATGTGGGTTGCGGATTTGACCC
F17 ²	2524-2547	reverse	CCGATCTTGACTCCATGCACAGCC
F10 ²	3570-3596	forward	GGTCTTGATTGGATTGTCGTAATCGC
F12 ²	3850-3873	reverse	AGTACTACTGTGTCCACAGGCACG
SeqC ²	5011-5031	forward	GTTCTTGACTGGCATCCAGG
F11 ²	5212-5239	reverse	CGTTAGCGTCGCGTGGCAAGCCACCGTG
F6 ²	5732-5754	forward	ATGCTGGAGAARGTTGGCATCAC
SeqD ²	5856-5879	reverse	TCTGTGCCTCAGACCAACAAGCCC
F4 ²	7712-7738	forward	GAYYTHGGNTGYGGYMGVGGNGGMTGG
F7 ²	7892-7917	reverse	ATGTCACAYAYGATSGTGTGCAATC
Flavi1 ²	8831-8850	forward	TGYRTNTAYAACAYVATGGG
F14 ²	8895-8922	forward	CACGSATYATCTGGTACATGTGGCTSGG
Flavi3 ²	8903-8922	forward	ATHTGGTWTATGTGGYTNGG
Flavi2 ²	9081-9100	reverse	GTGTCCCANCCDGCDDRYTC
SeqE ²	9630-9651	forward	GTGATGGACGGGAGATTATCGC
F15 ²	10703-10723	reverse	ATCCTGTGCGCCCTCACCTTG

¹ Gaunt *et al.*, 2005, ² Parreira *et al.*, 2012

Pro PCR byly použity následující kombinace primerů:

Tabulka č. 12: Kombinace primerů pro PCR

forward	reverse	forward	reverse
Uni for	Uni rev	F6	F7
Uni2 for I	Uni2 rev I	F10	F11
Uni2 for II	Uni2 rev II	F13	F17
Flavi 1	Flavi 2	F16	SeqG
Flavi 3	Flavi 2	SeqC	F11
F4	Flavi 2	F6	SeqD
SeqC	SeqD	F14	Flavi 2
SeqF	SeqG	SeqE	F15
F4	F7	F10	F12

Pro většinu kombinací jsem použila složení ampifikační směsi a teplotní cyklus popsany v tabulkách č. 8 a 9. V případě primerů „Uni“ byl teplotní cyklus lehce pozměněn a

zkoušela jsem rovněž do směsi přidat 2 µl cDNA pro zvýšení šance na úspěšnou amplifikaci. S primery „Uni“ byla také použita metoda „nested PCR“, která využívá dva páry primerů, vnitřní a vnější. První pár primerů (vnější) amplifikuje úsek, pro který je templátem genomická cDNA, a vymezí tak určitý lokus. Druhý pár primerů (vnitřní) amplifikuje úsek, pro který je templátem produkt předchozí reakce, a tím se amplifikuje pouze potřebná sekvence. V případě primerů „Uni“ byly v původním článku navrženy Uni For a Uni Rev jako vnější pár primerů a jako vnitřní pár alternativně kombinace Uni2 For I/Uni2 Rev I a Uni2 For II/Uni2 Rev II.

Tabulka č. 13: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (kombinace primerů „Uni“)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	95 °C	3 min
30×	94 °C	30 s
	45 °C	30 s
	75 °C	1 min
1×	72 °C	5 min

Pro amplifikaci cDNA byly postupně vyzkoušeny PPP Master Mix a EmeraldAmp GT PCR Master Mix. Vzhledem k tomu, že se výsledky amplifikace použitím jiné PCR směsi nezměnily, byl v naprosté většině reakcí používán PPP Master Mix, který je cenově dostupnější.

3.2.5 Elektroforéza, izolace DNA z PCR produktů a sekvenační reakce

Použité chemikálie pro elektroforézu a izolaci DNA z PCR produktu:

- TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica)
- agaróza (Invitrogen)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen)
- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- sekvenační primery v koncentraci 3,2 pmol/µl
- PCR H₂O (Top-Bio)

U produktů získaných polymerázovou řetězovou reakcí byla následně ověřována horizontální elektroforézou přítomnost specifického amplikonu. Elektroforéza byla prováděna s 1% agarózovým gelem a puftrem TAE (1× koncentrovaný). Poté, co byla agaróza s puftrem povařena, byl k této směsi po jejím částečném vychladnutí přidán SybrSafe, který slouží k zviditelnění DNA pod UV světlem. Jako marker, který umožňoval odečíst velikost přítomných amplikonů, byl používán GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Po proběhnutí elektroforézy byl každý gel fotograficky zdokumentován.

Ve většině případů jsem pro následnou izolaci DNA jednotlivé pozitivní proužky vyřezávala z gelu pod UV světlem, a to pomocí sterilního skalpelu. Vyzkoušela jsem však také izolaci DNA přímo z PCR produktu, kterého byla na gel nanesena vždy pouze polovina (10 µl), a zbývající část tak mohla posloužit právě pro izolaci DNA. Ve všech případech byl pro izolaci DNA použit komerční kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) a postupovala jsem přesně dle pokynů výrobců.

Izolovaná DNA byla následně sekvenována. Pro sekvenační reakci byla připravována směs 6,5 µl DNA a 1,5 µl příslušného sekvenačního primeru o koncentraci 3,2 pmol/µl. Sekvenační primery byly připravovány ředěním z jednotlivých zásobních amplifikačních primerů (viz výše). Jelikož se v některých případech ukázalo, že je do reakce přidáváno příliš velké množství DNA, které reakci inhibuje, byl poměr složek upraven. Směs tak tvořil 1 µl DNA, 1 µl sekvenačního primeru a 6 µl PCR H₂O. Takto připravené vzorky byly zasílány do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK Praha, kde byla prováděna vlastní sekvenace.

3.2.6 Vyhodnocení sekvencí a fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly v podobě fluorescencečních křivek kontrolovány pomocí programu BioEdit a následně prostřednictvím algoritmu BLAST porovnány s dostupnými sekvencemi v databázích NCBI (Národní centrum pro molekulárně-biologické informace v USA, www.ncbi.nlm.nih.gov). U sekvencí odpovídajících flavivirům pak byly provedeny následné úpravy v programu Geneious. Šlo zejména o opravu chyb působenou dvojitým čtením a přípravu prvních alignmentů pro fylogenetickou analýzu.

Finální alignment sekvencí byl proveden pomocí programu ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) s defoltně nastavenými podmínkami. Použito bylo pět námi nově získaných sekvencí flavivirů specifických pro hmyz a výběr zahrnující 48 sekvencí (z databáze GenBank) nejpodobnějších našim sekvencím na základě hledání pomocí algoritmu BLAST a sekvence reprezentující hlavní skupiny cISFs. Takto připravená matice

byla zkontrolována v programu BioEdit, sekvence byly zkráceny na stejnou délku a v případě nekompletních sekvencí byl doplněn znak „N“.

Pro konstrukci fylogenetických stromů byla použita bayesovská metoda v programu MrBayes verze 3.1.2. Program byl nastaven na 4 miliony generací se čtyřmi řetězci (dva nezávislé výpočty), bylo použito nastavení Vacmodel=4by4, nst=6, rates=invgamma, covarion=yes (evoluční model GTR+I+ Γ a covarion model pro povolení různých mutačních rychlostí; model byl vybrán na základě programu Modeltest). Přibližně první pětina všech stromů byla odstraněna jako „burnin“ (přesný počet odstraněných stromů byl zjištěn pomocí programu Tracer v1.6). Další použitou metodou byla metoda maximální věrohodnosti (ML) v programu PhyML; potřebné parametry byly získány pomocí programu modeltest (TrNef+I+ Γ). Stromy byly konstruovány deseti replikáty heuristického hledání. Pomocí bootstrapu 1000 replikátů byla zjištěna statistická podpora topologie vytvořených stromů. Výsledné fylogenetické stromy byly zobrazeny programem FigTree verze 1.4.2 a finálně graficky upraveny v programu Corel Draw.

3.3 Izolace virů na komářích buněčných kulturách C6/36

Použité pomůcky a chemikálie:

- klonální buněčná linie C6/36 ATCC z komárů *Ae. albopictus*
- Leibovitz's L-15 Medium (Gibco®)
- Pen Strep (Gibco®)
- L-glutamine 200mM (Gibco®)
- Tryptose Phosphate Broth (Gibco®)
- FBS (Gibco®)
- Kanamycin Sulfate (Gibco®)
- Fungizone® Amphotericin B 250 µg/ml (Gibco®)
- HEPES (1M) (Gibco®)
- kultivační láhve s plochou dna 25 cm² (CORNING® Flask)
- injekční stříkačky a jehly (Chirana)
- filtry Millex-GV Syringe filter unit, velikost pórů 0,22 µm (Millex®)
 - průměr 4 mm, PVDF membrána
 - průměr 33 mm, PES membrána
- inverzní mikroskop (IX50, Olympus Optica, Inc.)

Tabulka č. 14: Složení média L-15 pro různé použití při manipulaci s kulturami buněk C6/36

Označení média	Složení
L-15	Leibovitz's L-15 Medium + 1 % L-glutaminu, 1 % PenStrep, 5 % Tryptose Phosphate + 8 % FBS
L-15 bez FBS	Leibovitz's L-15 Medium + 1 % L-glutaminu, 1 % PenStrep, 5 % Tryptose Phosphate
L-15 + ATB + F	Leibovitz's L-15 Medium + 1 % L-glutaminu, 1 % PenStrep, 5 % Tryptose Phosphate + 8 % FBS + 1 % Kanamycinu + 3 % Fungizonu

3.3.1 Příprava buněk

Tkáňové kultury komářích buněk C6/36 byly uchovávány v kultivačních lahvích s plochou dna 25 cm² za teploty 28 °C. Pro infekce byly buňky pasážovány v poměru 1:5, tedy 2 ml buněk a 8 ml média „L-15“. Přibližně po třech dnech se buňky již dostatečně namnožily a vytvořily na dně lahve souvislou vrstvu.

3.3.2 Příprava vzorku

Uložené PCR pozitivní homogenáty vzorků (250 µl) byly rozmrazeny a zředěny přidáním 800 – 950 µl PBS. Takto naředěné homogenáty pak byly centrifugovány a supernatant byl pomocí jehly odebrán do injekční stříkačky. Po odejmutí jehly byl na stříkačku nasazen filtr (Millex-GV o průměru 33 mm) a vzorky byly přefiltrovány do sterilní zkumavky (1,5 ml, Eppendorf). Filtrování vzorků bylo nutné proto, aby se zabránilo kontaminaci buněk bakteriemi z těl komárů. Alternativně jsem používala rovněž menší filtry (Millex-GV o průměru 4 mm), které umožnily filtraci menšího objemu vzorku, a homogenát tak byl ředěn maximálně v poměru 1:1.

3.3.3 Postup při infekci buněčné kultury

Před samotnou infekcí bylo z kultury odlito médium do zvláštní falkony. K buňkám pak byly přidány 2 ml čerstvého média „L-15 bez FBS“. Do takto připravené buněčné kultury bylo napipetováno 200 – 500 µl přefiltrovaného vzorku a následovala inkubace 30 – 60 min při 28 °C. Po inkubaci byly ke kultuře přidány 2 ml původního odlitého média „L-15“ (viz výše) a 5 ml čerstvého média obohaceného o Kanamycin a Fungizone („L-15 + ATB + F“).

Buněčné kultury byly navraceny do 28 °C a pravidelně (v intervalu několika dní)

kontrolovány pod inverzním mikroskopem pro zaznamenání případného cytopatického efektu. Přítomnost flavivirů v kulturách byla kontrolována rovněž metodou PCR.

Následující pasáže virové infekce probíhaly stejně jako primární infekce kultury, pouze k připraveným buňkám bylo místo vzorku přidáváno 100 – 200 μ l média z již infikované kultury.

3.3.4 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Průkaz přítomnosti virových částic v buněčné kultuře transmisní elektronovou mikroskopií nám byl umožněn Státním zdravotním ústavem (SZÚ). Celého procesu včetně přípravy vzorků, kterou prováděli pracovníci Národní referenční laboratoře pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií, jsem měla možnost se zúčastnit.

Vzorky byly odebrány přímo z buněčné kultury, a to jak z média před centrifugací, tak i ze sedimentu buněk a supernatantu po stočení celého obsahu kultivační lahve. Z každého odběru bylo vytvořeno několik kapek, do kterých byly vloženy měděné sítky potažené formvarovou membránou a tenkou vrstvou uhlíku, které zde byly ponechány po dobu 20 minut a ihned po vyjmutí zafixovány. Samotné pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu (Philips Morgagni 286, FEI™) při zvětšení 89 000 \times prováděl RNDr. Daniel Krsek, který rovněž pořídil snímky virových částic pomocí fotoaparátu CCD MegaView II (Olympus). Velikost (průměr) pozorovaných virionů byla měřena pomocí programu iTEM (Olympus). Následné úpravy fotografií (oříznutí snímků, zvýšení kontrastu a jasu) jsem prováděla v programu Corel PHOTO-PAINT X3.

3.4 Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu

3.4.1 Laboratorní chov komárů *Culex quinquefasciatus*

Ve své práci jsem měla možnost využít jedince z chovu komárů druhu *Culex quinquefasciatus* (původ: Hyderabad, Indie), který je v naší laboratoři dlouhodobě zaveden. O tuto kolonii jsem také značnou část svého magisterského studia pečovala. Komáři se chovají v nylonových sítích navlečených na kovovou konstrukci (40 \times 40 \times 40 cm) v místnosti, kde jsou udržovány stálé podmínky 26 °C a 60% vlhkosti. Pravidelně se jim zde také střídá režim osvětlení (cca 14/10). Chovaným jedincům je třikrát týdně obměňován 30 – 50% cukerný roztok vsáknutý do vaty, který mohou průběžně sát. Jednou až dvakrát týdně pak mají samice možnost sát na uspané myši. Jako potrava larvám chovaným v lavorech s vodou slouží vločkové krmivo pro akvarijní rybky TetraMin®.

3.4.2 Experimentální infekce

3.4.2.1 Infekce cukernou potravou

Po ověření ochoty komárů sát směs média „L-15“ (viz kapitola 3.3) a roztoku sacharózy, jsem se pokusila infikovat komáry z našeho chovu právě prostřednictvím cukerné potravy. Na experimenty byli samci a nenasáté samice různého stáří odebráni do zvláštní menší nylonové sítě. Dva dny před infekcí jim byla odebrána potrava a po dobu 24 hodin před infekcí neměli k dispozici ani vodu, aby se zvýšila ochota sání podané infekční směsi.

Směs byla tvořena médiem z infikované kultury a obarveným cukerným roztokem v poměru 1:3. Médium bylo v některých případech pouze odebráno z kultivační lahve, při posledním experimentu pak bylo koncentrováno centrifugací. Po úvodním stáčení ($10\,000\times g/30$ sekund) byl nejdříve odebrán sediment buněk a po následné centrifugaci ($10\,000\times g/30$ minut) bylo pro účely pokusů odebráno médium ze spodní části falkony. K infekční směsi média a cukerného roztoku bylo následně přidáno potravinářské barvivo a celá směs byla důkladně promíchána ve sterilním prostředí flowboxu. Infekční směs byla komárům podána vsáknutá ve vatě, ze které měli možnost sát po dobu 1,5 – 3 hod. Zbytek materiálu ze směsi byl následně přidán k buněčné kultuře C6/36 (viz kapitola 3.3.3) pro ověření schopnosti infekce. V síti byli po odebrání infikované potravy ponecháni pouze nasátí jedinci, které bylo možné identifikovat díky zbarvenému cukru ve voleti.

3.4.2.2 Infekce sáním krve

Pro experimentální nákazu komárů přes krev jsem do zvláštní sítě odebrala nenasáté samice různého stáří z našeho chovu. I v tomto případě jim byla dva dny před infekcí odebrána cukerná potrava a jeden den před infekcí také voda.

Koncentrované médium z infikované buněčné kultury (viz kapitola 3.4.2.1) bylo smícháno se sterilní, defibrinovanou a inaktivovanou králíčí krví v poměru 1:1. Na sterilní skleněné krmítko byla napnuta pomocí proužků parafilmu membrána v podobě kuřecí kůžičky. Krmítko bylo naplněno 3 ml infekční krve a zahříváno na 37 °C pomocí vodní lázně s vnější cirkulací. Ke krmítku byla nylonovým rukávem připevněna síťka se samicemi komárů tak, aby bylo samicím umožněno přes membránu sát. Sání ve tmě probíhalo 1,5 hodiny a po ukončení sání byly ze sítě pomocí exhaustoru vytříděny nenasáté samice. V síťce tak zůstali pouze jedinci, kteří krev prokazatelně sáli.

3.4.2.3 Infekce larev

Tento pokus byl prováděn na základě publikace Lutomiah *et al.*, 2007. Larvy prvního a druhého instaru byly přeneseny do kultivační lahve s kulturou obsahující virovou infekci. Larvy nebyly jeden den před infekcí krmeny a v kultuře byly ponechány po dobu 1,5 hodiny, aby měly dostatek času pozřít infikované buňky či uvolněné viriony v médiu. Následně byly pomocí plastové pipety přeneseny do zvláštního laboru s čistou odstátou vodou a krmeny standardním způsobem (viz kapitola 3.4.1). Vylíhlí dospělci byli umístěni do speciální sítě, kde o ně bylo dále pečováno běžným způsobem, ovšem bez možnosti sání krve (opět viz kapitola 3.4.1).

3.4.2.4 Intrathorakální injekce

K injekci bylo připraveno koncentrované médium z infikované buněčné kultury (viz kapitola 3.4.2.1). Osmdesát jedinců (40 samců a 40 samic) bylo postupně imobilizováno na ledu a následně jim bylo injikováno 50,6 nl infekčního média rychlostí 23 nl/sekundu pomocí automatického injikátoru Nanoject II (Drummond Scientific Company). Skleněné jehly byly připraveny na přístroji PC-10 Puller (Narishige group) a zabroušeny pomocí přístroje EG-44 Microgrinder (Narishige group). Jako minerální olej potřebný pro vytvoření tlaku v injektoru byl použit Mineral Oil M5904 (Sigma-Aldrich).

4 VÝSLEDKY

4.1 Odchyt komárů

Během let 2013 až 2015 se mi podařilo odchytnout celkem 9 658 samic komárů. Naprostá většina z nich (8 843 samic) pocházela z odchytů v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň, kde probíhaly odchytové pomoci šesti CDC pastí v průběhu několika po sobě následujících nocí během všech tří let. Celkem 730 komárů jsem odchytila během tří po sobě následujících nocí pomocí CDC pastí v roce 2013 v údolí potoka Zábrdky.

Tabulka č. 15: Odchyty komárů pomocí CDC pastí v letech 2013 – 2015

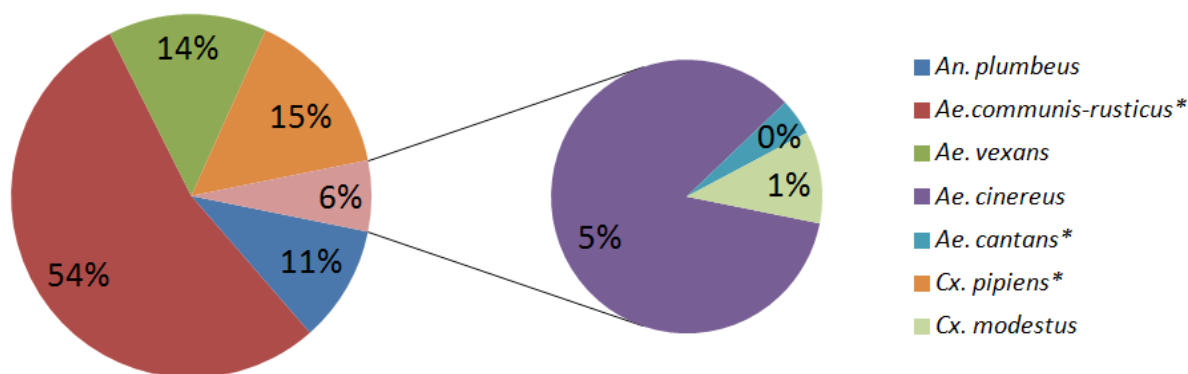
Lokalita odchytu	Termín odchytu	Počet CDC pastí	Teplota při instalaci / ukončení činnosti pastí	Počet odchycených komárů
Údolí Zábrdky	14. – 17. 8. 2013 (3 noci)	6	17 °C/13 °C	730
			18 °C/14 °C	
			21 °C/15 °C	
NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň	20. – 29. 7. 2013 (8 nocí)	6	15 °C/16 °C	6367
			15 °C/18 °C	
			24 °C/19 °C	
			24 °C/20 °C	
			24 °C/17 °C	
			23 °C/17 °C	
			28 °C/25 °C	
			31 °C/23 °C	
NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň	26. 7. – 4. 8. 2014 (9 nocí)	6	27 °C/22 °C	1311
			25 °C/14 °C	
			28 °C/25 °C	
			27 °C/20 °C	
			27 °C/21 °C	
			19 °C/18 °C	
			20 °C/21 °C	
			23 °C/21 °C	
			22 °C/16 °C	
NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň	25. 7. – 2. 8. 2015 (8 nocí)	6	20 °C/16 °C	1165
			21 °C/18 °C	
			17 °C/16 °C	
			20 °C/15 °C	
			14 °C/15 °C	
			19 °C/12 °C	
			19 °C/16 °C	
			22 °C/17 °C	

Odchyty entomologickou sítí a sběr naletujících samic exhaustorem v roce 2015 v údolí potoka Zábrdky a v Polabí (viz kapitola 3.1.1) byly daleko méně efektivní. Z první jmenované lokality jsem takto získala pouze 46 samic z komplexu *Cx. pipiens*, z Polabí pak jen 39 samic (37 samic komplexu *Ae. cantans* a 2 samice z komplexu *Ae. communis-rusticus*).

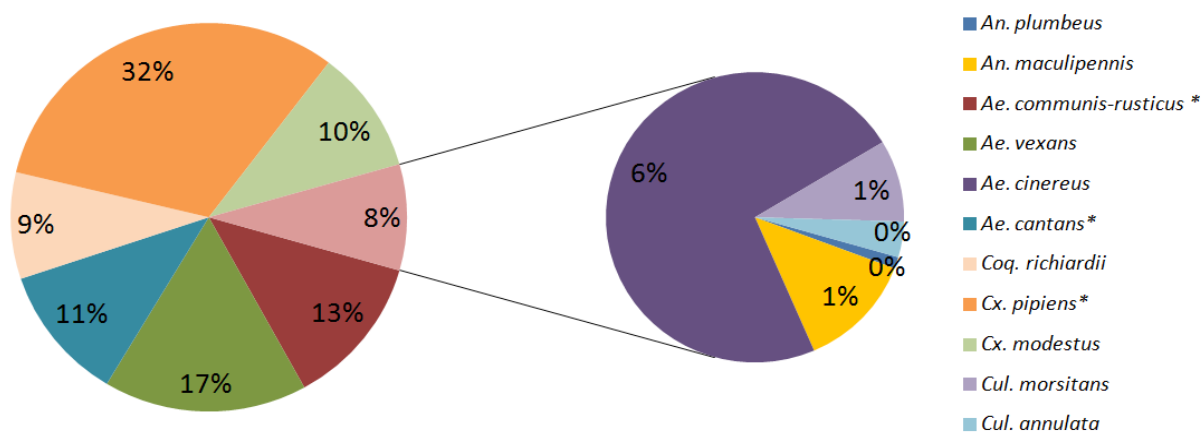
4.1.1 Druhové složení a porovnání početnosti odchycených komárů

V údolí Zábrdky se mi podařilo odchytit celkem 776 samic komárů, z toho 379 jedinců komplexu *Aedes communis-rusticus* a 156 samic komplexu *Culex pipiens*. Počet zástupců ostatních druhů komárů se pohyboval pouze v řádu desítek jedinců. V NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň jsem během let 2013 až 2015 odchytila celkem 8 843 samic komárů. Nejvíce zastoupen zde byl komplex *Cx. pipiens* s počtem 2 792 jedinců, následován druhem *Ae. vexans* (1 466 jedinců), komplexem *Ae. communis-rusticus* (1 113 jedinců) a komplexem *Ae. cantans* (997 jedinců). Méně než tisíc samic jsem odchytila z druhů *Cx. modestus* (907), *Coquillettidia richiardii* (786) a *Ae. cinereus* (570). Nejnižší počet jedinců jsem pak v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň získala u druhů *Anopheles maculipennis* (100), *Culiseta morsitans* (71), *Culiseta annulata* (31) a *Anopheles plumbeus* (10). Většina (7 097 jedinců) z celkového počtu 9 658 komárů byla získaná během odchytů pomocí CDC pastí v roce 2013.

Následující srovnání pomocí grafů (obrázky č. 7 a 8) se týká již jen komárů odchycených pomocí CDC pastí, a to vzhledem k malému počtu komárů odchycených alternativními způsoby (viz výše). Zatímco při odchycích v údolí potoka Zábrdky byl nejvíce zastoupen komplex *Ae. communis-rusticus*, při odchycích v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň byli nejčastěji odchytáváni jedinci komplexu *Cx. pipiens*.

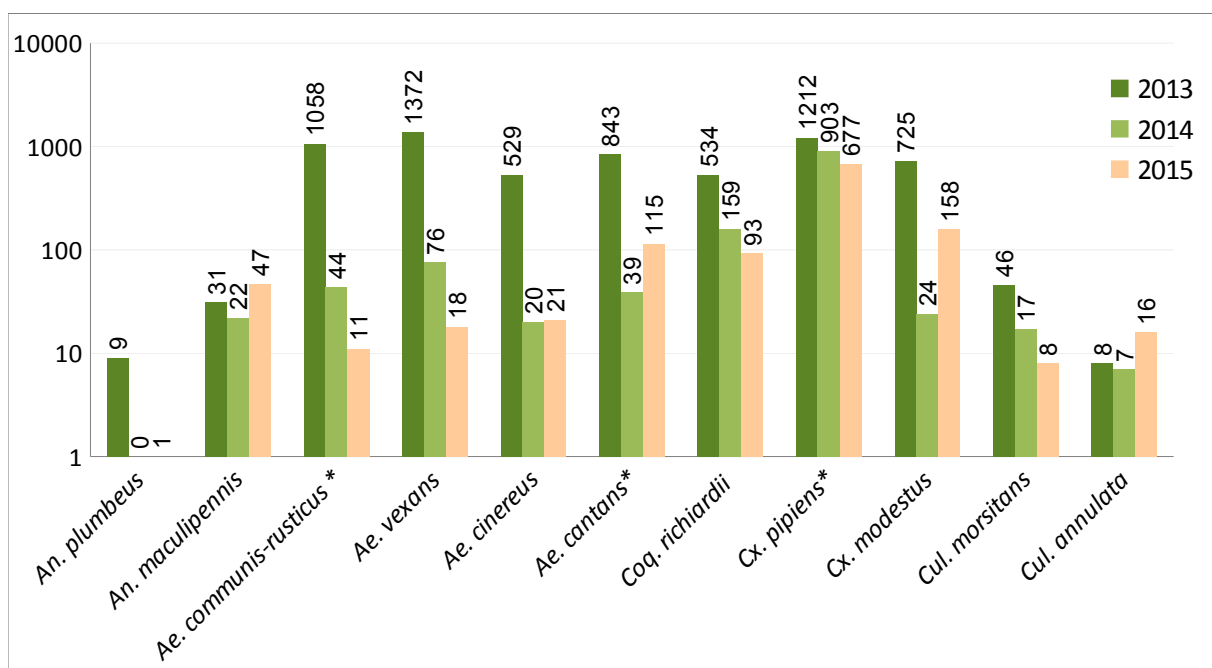


Obrázek č. 7: Zastoupení jednotlivých druhů (komplexů druhů) v odchycích pomocí CDC pastí v údolí potoka Zábrdky. * komplex druhů



Obrázek č. 8: Zastoupení jednotlivých druhů (komplexů druhů) v odchytech pomocí CDC pastí v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně v letech 2013 – 2015. * komplex druhů

V NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně se mi zdaleka největší počet komárů podařilo odchytit v roce 2013. Během dvou následujících let byl počet odchycených jedinců oproti roku 2013 jen přibližně šestinový, a to přesto, že odchyty probíhaly na identických místech, ve stejném období a za srovnatelných teplotních i klimatických podmínek (viz tabulka č. 15). Nejmenší rozdíly v početnosti odchycených zástupců jsem zaznamenala u komplexu *Cx. pipiens*, jak vyplývá z následujícího grafu.



Obrázek č. 9: Porovnání počtu odchycených samic jednotlivých druhů (komplexů druhů) v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně v letech 2013 – 2015. Logaritmické měřítko; * komplex druhů.

Rozdíly v počtech odchycených jedinců celkově i v rámci druhů či komplexů druhů jsem zaznamenala také při srovnání tří různých typů odchyťových míst na území NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně (viz kapitola 3.1.1 a obrázky 4 – 6). Porovnání vychází z odchytů v roce 2013 a z velké části odchytů v roce 2015. V roce 2014 jsem jednotlivá místa odchytů neodlišovala.

Tabulka č. 16: Porovnání odchyťových míst na území NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně

Druh (komplex druhů)	Počet odchycených komárů na jednotlivých typech odchyťových míst		
	Pastí v lesíku	Pastí na březích tůní	Pastí v porostu rákosí
<i>An. plumbeus</i>	2	4	3
<i>An. maculipennis</i>	5	6	18
<i>Ae. cantans</i>	181	239	412
<i>Ae. cinereus</i>	134	57	318
<i>Ae. communis-rusticus</i> komplex	251	249	545
<i>Ae. vexans</i>	235	409	720
<i>Cx. modestus</i>	23	158	663
<i>Cx. pipiens</i> komplex	251	344	1187
<i>Cul. annulata</i>	3	5	16
<i>Cul. morsitans</i>	0	1	53
<i>Coq. richiardii</i>	150	142	301
celkem	1235	1614	4236

Celkově jsem nejvíce komárů odchytila pomocí pastí umístěných v porostu rákosí na břehu rybníka. Rozdíly mezi odchyťovými místy v okolí tůní a stanovišti v porostu stromů nejsou již tak výrazné a liší se spíše u jednotlivých druhů.

4.1.2 Zastoupení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium* v rámci komplexu *Cx. pipiens*

Bližší určení jedinců z komplexu *Cx. pipiens* jsem prováděla pomocí metody PCR se specifickými primery. Celkem jsem takto analyzovala 74 vzorky z obou lokalit, kde probíhaly odchty pomocí CDC pastí. Z odchytů v údolí Zábrdky jsem použila všechny dostupné vzorky s komáry komplexu *Cx. pipiens* (některé zásobní homogenáty byly již dříve použity na jiné účely), z odchytů v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně jsem vzhledem k velkému počtu odchycených jedinců z komplexu *Cx. pipiens* vybrala jen 20 (respektive 21) vzorků z každého roku. Každý vzorek obsahoval homogenát z deseti jedinců, a zastoupení obou druhů tak mohu vyhodnotit pouze přibližně.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl přítomen druh *Cx. pipiens*, celkově se tak zdá být na obou lokalitách dominantním druhem. Jedinci druhu *Cx. torrentium* byli detekováni pouze v několika (8) vzorcích, zejména z odchytové lokality v údolí potoka Zábrdky.

Tabulka č. 17: Zastoupení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium*

lokalita	rok	Počet analyzovaných vzorků (jedinců)	Počet vzorků s <i>Cx. pipiens</i>	Počet vzorků s <i>Cx. torrentium</i>
Údolí Zábrdky	2013	12 (120)	12	4
NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň	2013	21 (210)	21	0
	2014	21 (210)	21	3
	2015	20 (200)	20	1
celkem		74 (740)	74	8

4.2 Detekce flavivirové RNA

4.2.1 Detekce ISFs u odchycených komárů

Flavivirovou RNA se mi podařilo detekovat u zástupců téměř všech druhů (či komplexů druhů) odchycených komárů, jak ilustruje tabulka č. 18. Následná analýza získaných sekvencí prokázala, že se ve všech případech jednalo o specificky hmyzí flaviviry. Podíl jedinců infikovaných ISFs se u jednotlivých druhů (komplexů druhů) lišil, nicméně ani v jednom případě nepřesáhl 3 %.

Tabulka č. 18: Podíl jedinců infikovaných ISFs v rámci jednotlivých druhů (komplexů druhů)

Druh (komplex druhů)	Počet vzorků (jedinců celkem)	Z toho pozitivních vzorků (celkový počet jedinců v pozitivních vzorcích)	Odhadovaná prevalence flavivirových infekcí u komárů v % (SE)*
<i>An. maculipennis</i>	16 (100)	0	0,00 %
<i>An. plumbeus</i>	11 (86)	0	0,00 %
<i>Ae. cantans</i> komplex	118 (1036)	4 (40)	0,35 (0,17) %
<i>Ae. cinereus</i>	68 (609)	7 (72)	1,11 (0,41) %
<i>Ae. communis-rusticus</i> komplex	159 (1509)	1 (10)	0,06 (0,06) %
<i>Ae. vexans</i>	164 (1570)	2 (20)	0,12 (0,09) %
<i>Cx. modestus</i>	93 (912)	22 (215)	2,66 (0,56) %
<i>Cx. pipiens</i> komplex	303 (2948)	6 (60)	0,20 (0,08) %
<i>Cul. annulata</i>	8 (31)	0	0,00%
<i>Cul. morsitans</i>	11 (71)	2 (16)	1,99 (1,39) %
<i>Coq. richiardii</i>	85 (786)	1 (10)	0,12 (0,12) %
celkem	1036 (9658)	45 (443)	0,44 (0,07) %

* výpočet byl proveden pomocí EpiTools epidemiological calculators (<http://epitools.ausvet.com.au/>)

4.2.2 Vyhodnocení detekovaných flavivirových sekvencí

Při porovnání flavivirových sekvencí, které jsme detekovali u námi odchycených komárů, se sekvencemi dostupnými v genové bance (viz kapitola 3.2.6) i mezi sebou navzájem jsme zjistili, že se nám podařilo zachytit sekvence odpovídající čtyřem různým flavivirům. Tyto sekvence byly nejvíce podobné zástupcům ISFs a následná fylogenetická analýza (viz kapitola 3.2.6) jejich zařazení mezi flaviviry specifické pro hmyz potvrdila (viz obrázek č. 10). Odlišnosti od sekvencí ostatních známých ISFs spolu s jejich fylogenetickým zařazením naznačují, že by námi detekované sekvence mohly představovat čtyři dosud nepopsané druhy flavivirů.

„CxTFV-like flavivirus“

Většina námi detekovaných flavivirových sekvencí (33 z celkového počtu 45 sekvencí) byla navzájem téměř identická a náleží jednomu druhu viru. Tento druh flaviviru, jehož sekvence se nám podařilo získat z několika různých hostitelských druhů komárů (viz níže), se při porovnání pomocí algoritmu BLAST odlišuje od ostatních ISFs z více než 20 %. Tento virus jsem detekovala u komárů z NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně, kteří zde byli odchyceni v roce 2013 i v roce 2015 a také v jednom vzorku komárů odchycených v údolí potoka Zábrdky. Přestože jsme u 4 vzorků zaznamenali drobné odlišnosti (vždy jen v jediném nukleotidu, ale pokaždé na jiné pozici), které naznačují existenci více haplotypů tohoto viru, ve fylogenetické analýze jsme použili pouze dominantní sekvenci.

Sekvence (250 bp) :

```
AACATGATGGGGAAGAGGGAGAAGAAACCATCATCATTTGGAGAGGCCAAAGGCTCGC
GCATCATCTGGTACATGTGGCTAGGCAGTAGATTCCTGGAATATGAAGCGCTAGGCTTTCT
GAACGAGGATCACTGGGTGGCGAGAGAAAACCTTTCCATGTGGTGTGGGCGGAGTCGGTG
TGAAC TACTTTGGGTATTACTTAAAAGAGATAGCTCAACGGGGACGCTGGCTGATCGCTG
ATGACACCGCCGGCTGGGACAC
```

Hostitelské druhy, u nichž byl virus detekován:

Cx. modestus (22 vzorků)

Cx. pipiens komplex (4 vzorky)

Ae. cantans komplex (2 vzorky)

Ae. vexans (2 vzorky)

Ae. cinereus (1 vzorek)

Ae. communis-rusticus komplex (1 vzorek) – údolí Zábrdky

Coq. richiardii (1 vzorek)

„AeCinFV“

Sekvence tohoto viru byla získána ze šesti různých vzorků komárů druhu *Ae. cinereus* a jednoho vzorku komplexu *Cx. pipiens*. Všechny tyto vzorky pocházely z odchytů v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň z roku 2013. Sekvence je při porovnání pomocí algoritmu BLAST identická s ostatními ISFs pouze ze 78 %. I v tomto případě je tedy velice pravděpodobné, že se jedná o nový druh patřící do skupiny flavivirů. Dvě ze sedmi sekvencí (z komárů *Ae. cinereus*) se přes celkovou podobnost v některých nukleotidech od ostatních odlišovaly a označila jsem je zde jako „typ II“. Odlišnosti sekvencí typu I a typu II jsou na příslušných místech zvýrazněny.

Sekvence typ I (249 bp):

```
TAACATGATGGGGAAGAGGGAGAAGAAGCCAACAGTTGCCGGAGAACCAAAGGGTTCA
AGAACAATCTGGTACATGTGGCTTGGTAGCCGATACCTGGAATACGAGGCCCTTGGTTTT
CTCAATGAAGATCATTGGGTGTCACGCGAAAACTTTCCTGGAGGTGTTGGAGGCCAAGG
TGTCAACTATTTTGGAAATTACCTTGAGGAAATCGCCAAAAGAGGAAAATTTTTTGTGGC
TGATGACACCGCCGGCTGGGAC
```

Sekvence typu II (249 bp):

```
TAACATGATGGGGAAGAGGGAGAAGAAGCCGACAGTTGCAGGAGAGCCCAAAGGGTTCA
AGAACAATCTGGTACATGTGGCTCGGTAGCCGATACCTGGAATACGAGGCCCTTGGTTTT
CTCAATGAAGATCATTGGGTGTCACGCGAAAAATTTTCCTGGAGGTGTTGGAGGCCAAGGT
GTCAACTATTTTGGAAATTACCTTGAGGAAATCGCCAAAAGAGGAAAATTTTTTGTGGCT
GATGACACCGCCGGCTGGGAC
```

Hostitelské druhy, u nichž byl virus detekován:

Sekvence typu I:

Ae. cinereus (4 vzorky)

Cx. pipiens komplex (1 vzorek)

Sekvence typu II:

Ae. cinereus (2 vzorky)

U dvou vzorků komplexu *Ae. cantans* jsme získali relativně krátké sekvence (~100 nukleotidů), které podle dvojitého čtení naznačují, že se v nich vyskytovaly oba výše zmíněné viry, tedy „CxTFV-like“ i „AeCinFV-typ I“. Pozice, v nichž se dvojité čtení objevilo, obsahovalo vždy obě varianty, ve kterých se tyto dva viry odlišují.

„595c“

Tato sekvence byla detekována v jediném vzorku komplexu *Cx. pipiens*, který pocházel z odchytů v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň z roku 2015.

Sekvence (207 bp):

```
TAACATGATGGGGAAGAGGGAGAAGAAGACCTCAGCCATGGGACGAGCCAAGGGTTCG
CGCGTCATATGGTATCTTTGGTTAGGAGGTTAGATTCTTGAATACGAAGCCCTTGGGTTC
TAAACGCTGACCATTGGGTGGCACGGGACGTGTTGCCCTGTGGGGTGGGCGGCTTGGGA
GTGCAGTACCTTGGGAACATCCTCAGAGA
```

Hostitelské druhy, u nichž byl virus detekován:

Cx. pipiens komplex (1 vzorek)

„502“

Sekvence byla získána ze dvou vzorků obsahujících jedince druhu *Culiseta morsitans*. Oba tyto vzorky pocházely z odchytů z NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň, a to z let 2013 a 2014. Přestože je získaná sekvence relativně krátká, vyskytuje se v ní značné množství odlišností od ostatních ISFs.

Sekvence (149 bp):

```
CTCTCTCGCCACCCAATGGTCCTCATTCAAAAATCCAAGGGCCTCATACTCCAGGAACCTGCTTC
CCAGCCACATGTACCAAATCGTTCTTGATCCTTTCGGCTCTCCTGCCACGGTGGGTTTCTTCTCC
CTCTTCCCCATCATGTT
```

Hostitelské druhy, u nichž byl virus detekován:

Cul. morsitans (2 vzorky)

U některých vzorků se při PCR s univerzálními flavivirovými primery amplifikovala cDNA odpovídající mRNA komárů. Při podrobnějším porovnání získaných sekvencí jsem zjistila, že jejich část odpovídá krátkým sekvencím flavivirů, což amplifikaci vysvětlilo. Tyto úseky byly identické u vzorků pocházejících ze stejných druhů (komplexů druhů) komárů. Konkrétně se jednalo o dva vzorky druhu *Aedes vexans*, u kterých se na jednom konci získaných sekvencí vyskytovalo ~30 nukleotidů odpovídajících některým izolátům ISFs a také viru Usutu. Zbytek amplifikované sekvence (~200 bp) byl nejpříbuznější sekvencím mRNA jiných druhů komárů. Nicméně úseky odpovídající komáří mRNA a ISFs se zčásti překrývaly. Podobně velký úsek (~35 nukleotidů) identický se sekvencemi několika specificky hmyzích flavivirů se na podobné pozici vyskytoval také u amplikonu získaného z jednoho vzorku komárů komplexu *Aedes communis-rusticus*. U dvou vzorků komplexu *Cx. pipiens* se při porovnávání získaných sekvencí ukázalo, že jsou zde přítomny úseky odpovídající některým ISFs i MBFs o velikosti ~30 nukleotidů dokonce dva, ve středové a koncové části sekvencí. Jako ve všech předchozích případech odpovídaly získané sekvence celkově nejvíce mRNA komárů. Tyto vzorky byly vyhodnoceny jako negativní na přítomnost flavivirové infekce a nejsou uvedeny ani v tabuře č. 18.

4.3 Experimentální infekce

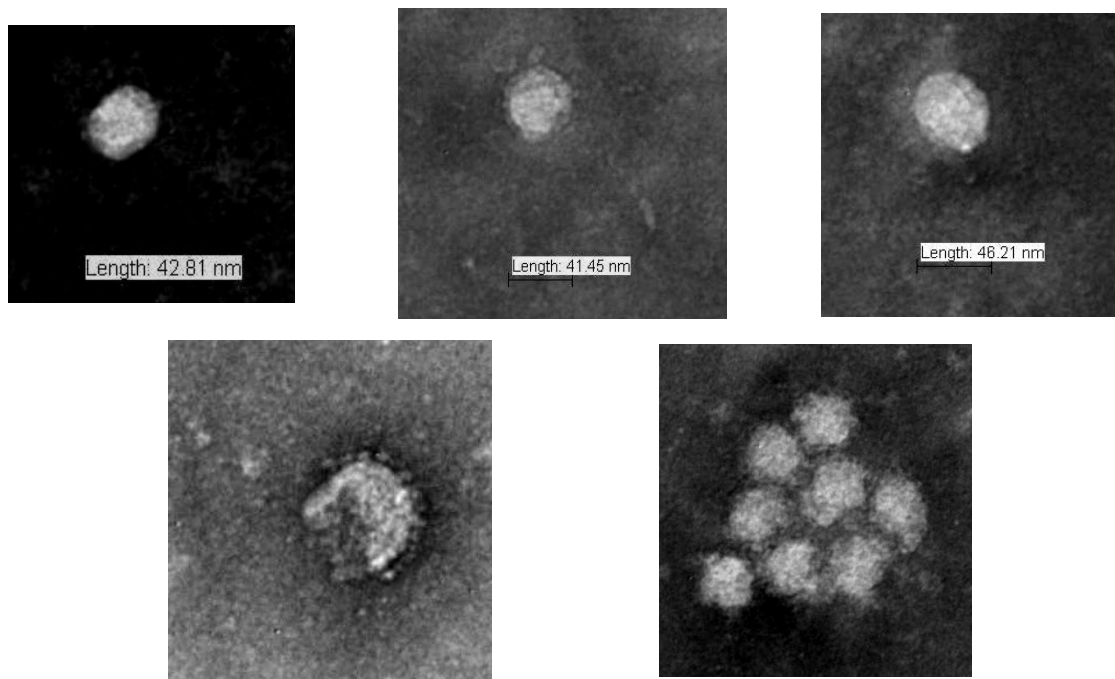
4.3.1 Izolace virů na komářích buněčných kulturách C6/36

Z několika vzorků, které byly PCR pozitivní na přítomnost ISFs, jsem se pokusila viry izolovat na kultuře buněk C6/36. Konkrétní vzorky byly vybrány na základě předpokládaného velkého množství virové RNA, kterou naznačovaly silné proužky (amplikony) zaznamenané po elektroforéze příslušných PCR produktů.

V úvodních experimentech jsem do kultur buněk C6/36 inokulovala homogenáty dvou vzorků, ve kterých byla detekována RNA viru „CxTFV-like“. Vzhledem ke kontaminaci kultur bakteriemi při přidání homogenátů v původním stavu, která vedla ke smrti buněk, jsem následně pokus zopakovala s přefiltrovaným (a tedy naředěným) materiálem. Přítomnost flavivirů v kultuře byla ověřována odebráním 140 µl média s buňkami, ze kterého byla izolována RNA a po přepsání do cDNA byla provedena PCR. Sedm dní po inokulaci homogenátů jsem z původních kultur přenesla 200 µl média do nových připravených kultur (proběhla „první pasáž infekce“). Médium odebrané z původních kultur 10 dní po infekci a také médium odebrané 10 dní po první pasáži „infekce“, vyšla PCR negativní, a to u obou

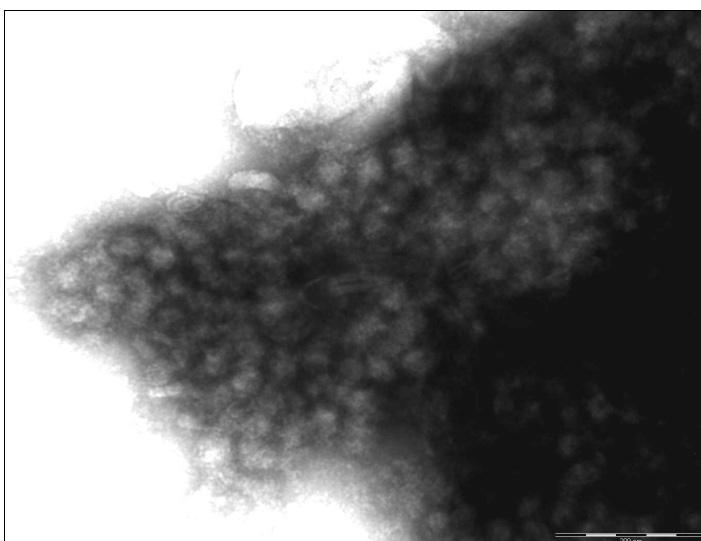
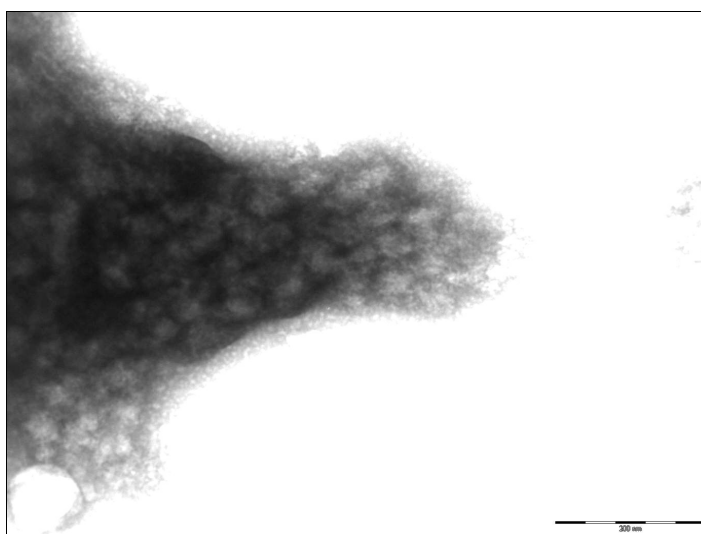
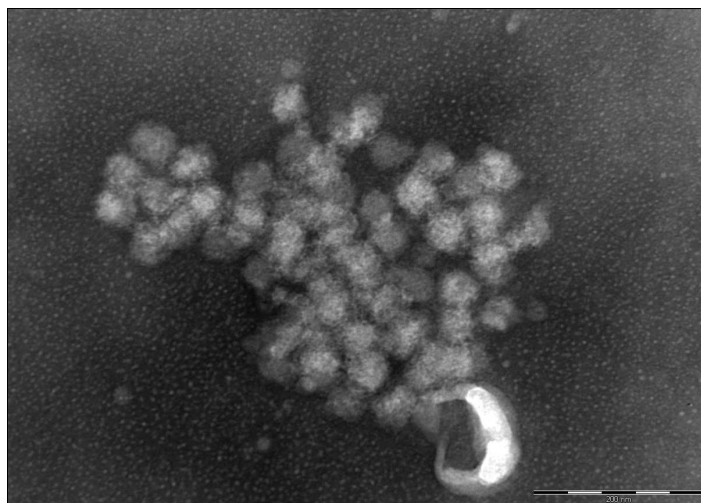
homogenátů. Infekce jsem proto vyhodnotila jako neúspěšné a pokus jsem ukončila. Stejně výsledky po deseti dnech jsem získala i v případě inokulace třetího homogenátu, ve kterém byl dříve detekován virus „CxTFV-like“. Přesto jsem v experimentu pokračovala a devatenáctý den po inokulaci vzorku se mi v kultuře podařilo flavivirovou RNA detekovat. Úspěšnost infekce potvrdila také PCR s materiálem z kultury, kam byla sedm dní po úvodní inokulaci infekce pasážována. Také v případě této kultury byl PCR pozitivní až materiál odebraný po dvanácti dnech od pasáže, dříve odebrané vzorky vycházely negativní. Na základě pozorování amplikonu (proužku) na gelu po elektroforéze se zdálo, že je v kulturách přítomno menší množství viru než v původním homogenátu. Proužky srovnatelné intenzity s původními PCR produkty byly zaznamenány až 32 dní po počáteční inokulaci homogenátu, a to v kultuře s druhou pasáží infekce.

V žádné z infikovaných kultur nebyl pozorován cytopatický efekt, který by je zřetelně odlišoval od negativních kontrol, a to ani po značném počtu pasáží virové infekce (>30). Úspěšná izolace a namnožení viru byla definitivně prokázána pomocí transmisní elektronové mikroskopie ve třetí pasáži viru na buňkách C6/36 (viz obr. 11 – 18). Největší množství virionů bylo pod mikroskopem pozorováno v materiálu, který byl odebrán z média před centrifugací obsahu kultivační lahve. Morfologie a velikost virových částic odpovídá pozorováním u ostatních zástupců čeledi *Flaviviridae* (např. Cook *et al.*, 2009).



Obrázky č. 11 – 15: Viriony flaviviru „CxTFV-like“ z kultury

TEM, zvětšení 89 000×, velikost virionů měřena pomocí programu iTEM
autor fotografií: RNDr. Daniel Krsek



Obrázky č. 16 – 18: Viriony flaviviru „CxTFV-like“ s fragmenty rozpadlých buněk C6/36.
 TEM, zvětšení 89 000×, autor fotografií: RNDr. Daniel Krsek

Izolace viru „AeCinFV“ na buňkách C6/36 se bohužel nezdařila, přestože byl zachován stejný postup infekce buněčných kultur jako u viru „CxTFV-like“. Pokus byl opakován se čtyřmi různými homogenáty a negativní výsledky nezměnilo ani použití filtrů s menším průměrem, díky kterému nebylo nutné před filtrací homogenáty ředit v poměru více než 1:1. Přítomnost flavivirů v kulturách byla na základě zkušeností s virem „CxTFV-like“ ověřována delší dobu a přes negativní výsledky PCR byla „infekce“ několikrát pasážována (max. sedmkrát), než byl pokus s jednotlivými vzorky vyhodnocen jako neúspěšný a ukončen.

4.3.2 Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu

Virem „CxTFV-like“, který se mi podařilo izolovat na tkáňových kulturách buněk C6/36, jsem se pokusila experimentálně infikovat komáry *Culex quiquefasciatus* z našeho laboratorního chovu.

Pokusy o perorální infekci dospělců byly prováděny s cukernou potravou a také sáním krve. Pokus s cukernou potravou byl za lehce pozměněných podmínek opakován celkem čtyřikrát, ani v jednom případě však nebyl úspěšný. Ani sání krve obsahující virus „CxTFV-like“ k infekci komárů nevedlo. Po odebrání cukerné potravy i krve komárům, kteří na ní měli možnost sát, byla přítomnost infekce schopných virů ověřována inokulací do kultur buněk C6/36 a ve všech případech se zde virus úspěšně namnožil. U jedinců, kteří byli usmrceni a testováni bezprostředně po sání infekční potravy, se RNA viru „CxTFV-like“ také podařilo detekovat. Komáři, kteří byli odebráni v rozmezí prvního až dvacátého prvního dne po infekci, však byli všichni PCR negativní.

Dalším experimentem byla intrathorakální injekce infekčního média. Na pokus bylo použito 80 komárů, z nichž většina bezprostředně po injekci nejevila známky vážnějších problémů či poranění. Do druhého dne však přežilo pouze 28 jedinců, z nichž dalších pět uhynulo v průběhu následujících dnů. Důvodem byla pravděpodobně nepřesná manipulace s injektorem či sepse způsobená zanesením cizorodých materiálu do rány vytvořené jehlou. Přítomnost flaviviru jsem u přeživších komárů (23 jedinců) ověřovala 4., 8., 17., a 21. den po infekci a také v tomto případě byli všichni zkoumaní jedinci PCR negativní.

Posledním pokusem o infekci, který jsem vyzkoušela, byla nákaza larev komárů požitím infikovaných buněk C6/36 či infekčního média obsahujícího virové částice. Přítomnost „CxTFV-like“ viru jsem ověřovala u patnácti larev posledního instaru čtvrtý den p. i. a u vylíhlých dospělců 4., 8., 17. a 21. den po infekci. Přestože jsem měla v tomto případě k dispozici větší počet komárů (15 larev a 48 dospělců), flavivirovou RNA se mi u žádného jedince detekovat nepodařilo.

5 DISKUSE

5.1 Odchyt komárů

Cílem odchytů nebylo zmapování komářích fauny v konkrétních oblastech (tomuto tématu se podrobně věnuje mnoho jiných prací, například pro oblast NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň diplomová práce Mgr. Jany Rádové, PhD., 2008 či publikace Votýpka *et al.*, 2008), ale získání materiálu pro detekci flavivirových infekcí. Početní zastoupení jednotlivých druhů (komplexů druhů) v odchycích v této práci uvádím zejména proto, že může mít vliv na vyhodnocení prevalence virů u různých hostitelských druhů. Ze stejného důvodu je nutné brát v potaz rozdíly v celkovém množství odchycených komárů z jednotlivých lokalit a z různých časových sezon.

V údolí potoka Zábrdky probíhal odchyt komárů pomocí CDC pastí pouze jednou, v roce 2013, a to během tří odchytových nocí. V dalších letech zde odchity tímto způsobem neprobíhaly hlavně proto, že v letech 2014 a 2015 byla dříve zaplavovaná místa v údolí vyschlá a k intenzivnímu výskytu komárů zde během letních měsíců nedocházelo. V NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň probíhaly odchity během let 2013 – 2015 ve stejném období v roce (na přelomu července a srpna) a po stejně dlouhou dobu (8 – 9 nocí). Přesto jsem zde zaznamenala zásadní rozdíl ve výskytu komárů mezi rokem 2013 a dvěma následujícími léty, kdy se mi podařilo odchytit pouze přibližně šestinové množství jedinců ve srovnání s prvním rokem odchytů. Musela jsem také pozměnit umístění některých CDC pastí, protože stav vody v tůních i menších tůňkách se významně změnil a některá místa podobně jako v údolí Zábrdky zcela vyschla. Důvodem zmíněných fenoménů (vysychání tůňek a menší počet zaplavených míst) byl pravděpodobně rozdíl ve srážkovém úhrnu v měsících, které odchytům předcházely. Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) uvádí, že v roce 2013 byly v Jihočeském kraji srážkově podprůměrné měsíce březen, duben a červenec (82, 37 a 53 % dlouhodobého srážkového normálu). V roce 2014 to však byly měsíce únor (21 %), březen (77 %), duben (71 %) a červen (35 %). V roce 2015 pak byl naměřen ve srovnání s dlouhodobým průměrem menší úhrn srážek v únoru (24 %), dubnu (57 %), květnu (85 %), červnu (72 %) i v červenci (36 %). Obdobné hodnoty byly zaznamenány pro území celé České republiky (<http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-srazky>). Právě výrazné změny v celkovém úhrnu srážek v první polovině roku 2014 i 2015 měly pravděpodobně zásadní vliv na výskyt a početnost komárů, zejména pak některých druhů. Například samičky

rodu *Aedes*, u kterého byl pokles v počtu odchycených jedinců všech druhů mezi roky 2013 a 2014 nejvýraznější, kladou vajíčka jednotlivě na vlhká místa a k vývoji larev dochází až po jejich zatopení (Kramář, 1958). K zatopení mnoha takových míst v odchytových lokalitách v roce 2014 a 2015 však pravděpodobně vůbec nedošlo. Naopak samice druhů z komplexu *Cx. pipiens*, u kterého nebyly rozdíly v množství odchycených komárů v jednotlivých letech ve srovnání s ostatními druhy tak velké, kladou vajíčka přímo na vodní hladinu (Kramář, 1958), a jejich vývoj tak pravděpodobně nebyl trvajícím suchem zasažen v takové míře jako u ostatních rodů komárů.

Druhovú determinace odchycených komárů byla v některých případech prováděna pouze na úroveň komplexů druhů (*Aedes cantans* komplex, *Aedes communis-rusticus* komplex a *Culex pipiens* komplex). Důvodem byla snaha udržet komáry při určování ve zmraženém stavu, aby v nich nedošlo k poškození potencionálně přítomných virových částic či virové RNA. Komplikací při druhové determinaci byla také námraza či orosení těl komárů, kteří byli do té doby uchovávaní v teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, což znemožnilo pozorování některých znaků zásadních pro určování komárů z těchto komplexů do jednotlivých druhů. V případě komplexu *Culex pipiens* jsem se následně pokusila zjistit zastoupení druhů *Cx. pipiens* a *Cx. torrentium*, které komplex tvoří, a to pomocí PCR se specifickými primery cílenými na jeden z polymorfních genů, ve kterých se tyto dva druhy odlišují. Za tímto účelem jsem analyzovala celkem 74 vzorky z lokalit v okolí potoka Zábrdky i rybníka Řežabince, které zahrnovaly odchty z let 2013, 2014 i 2015. Jednalo se o vzorky obsahující homogenáty deseti jedinců, a výsledky jsou tak pouze orientační. Ve všech analyzovaných vzorcích jsem zaznamenala přítomnost druhu *Cx. pipiens*, přítomnost jedinců druhu *Cx. torrentium* potvrdila PCR pouze v osmi vzorcích. Druhý zmíněný druh tedy představoval přibližně 1 % (SE = 0,4 %) odchycených komárů komplexu *Cx. pipiens* (výpočet byl proveden pomocí EpiTools epidemiological calculators; <http://epitools.ausvet.com.au/>). Výrazně vyšší zastoupení (~96 %) druhu *Cx. pipiens* ve srovnání s druhem *Cx. torrentium* (~4 %) zaznamenala při analýze ~1500 jedinců také studie prováděná ve východním Rakousku, při které byla použita stejná metoda druhové determinace pomocí PCR (Zittra *et al.*, 2016). Naopak studie z České republiky, ve které byli samci (~1700 jedinců) určováni do druhu na základě morfologických znaků, prokázala 67% zastoupení druhu *Cx. torrentium* ve srovnání s 33% výskytem druhu *Cx. pipiens* (Hesson *et al.*, 2014). Zdá se, že významnou roli v úspěšnosti zachycení jedinců obou druhů hraje metoda odchytu, která se lišila i ve dvou výše zmíněných studiích. Je známo, že různé typy pastí chytají jednotlivé druhy komárů s různou účinností (Lühken *et al.*,

2014). Konkrétně CDC pasti lákají efektivněji druh *Cx. pipiens* než *Cx. torrentium*, a výsledky z odchytů touto metodou mohou být proto pro porovnání početnosti obou druhů v dané lokalitě zavádějící (Hesson *et al.*, 2015). Této hypotéze odpovídají také mé vlastní výsledky, při kterých jsem z lokality údolí potoka Zábrdky analyzovala celkem dvanáct vzorků s homogenáty jedinců komplexu *Cx. pipiens*. Osm z nich pocházelo z odchytů pomocí CDC pastí a detekován v nich byl pouze druh *Cx. pipiens*, zatímco ve zbývajících čtyřech vzorcích z odchytů entomologickou sítí byly prokázány oba druhy, tedy i *Cx. torrentium*.

Celkově se mi tedy podařilo prokázat, že ve vzorcích určených pro účely této práce jako *Cx. pipiens* komplex jsou zastoupeny oba druhy, které komplex tvoří. Výrazně dominantní zastoupení v nich však má druh *Cx. pipiens*, který byl detekován ve všech analyzovaných vzorcích. O výskytu těchto dvou druhů na daných lokalitách však tyto výsledky nevypovídají, protože mohou být ovlivněny metodou odchytu komárů především pomocí CDC pastí.

5.2 Detekce flavivirů

Flaviviry u odchycených komárů jsem detekovala pomocí univerzálních flavivirových primerů zaměřených na konzervovaný úsek genu pro nestrukturní protein 5 (Scaramozzino *et al.*, 2001). Celkem jsem flavivirovou RNA detekovala ve 45 vzorcích, zastupujících téměř všechny druhy (komplexy druhů) odchycených komárů s výjimkou druhů *Anopheles maculipennis*, *Anopheles plumbeus* a *Culiseta annulata*. Důvodem, proč se právě u těchto druhů nepodařilo flavivirovou RNA detekovat, je s největší pravděpodobností malý počet odchycených jedinců, které se mi u těchto druhů podařilo získat. Prevalence flavivirových infekcí u zbývajících druhů (komplexů druhů) komárů se pohybovala v rozmezí od 0,06 % do 2,66 %. Tyto hodnoty však mohou být zavádějící zvláště při porovnání druhů mezi sebou, a to právě z důvodu velkých rozdílů v počtu vzorků, které jsem měla v rámci konkrétních druhů a skupin k dispozici. Naprostá většina pozitivních vzorků pocházela z oblasti NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně, z oblasti údolí potoka Zábrdky pocházel pouze jediný vzorek, ve kterém jsem přítomnost flavivirů detekovala, a v Polabí jsem flavivirovou infekci nezaznamenala vůbec. Výsledky byly i v tomto případě ovlivněny rozdílným množstvím materiálu, který jsem z daných lokalit získala.

U celkem pěti vzorků (*Ae. vexans*, *Ae. communis-rusticus* komplex a *Cx. pipiens* komplex) jsem po elektroforéze PCR produktů zaznamenala přítomnost ampliconů, jejichž

sekvence však z převážné části odpovídaly komáří mRNA. Při důkladnější analýze těchto sekvencí jsem objevila krátké úseky (~30 nukleotidů), které odpovídaly sekvencím flavivirů, a amplifikaci mRNA komárů tak částečně vysvětlily. Délka a pozice detekovaných flavivirových sekvencí se v rámci jednotlivých druhů (komplexů druhů) komárů shodovaly, při porovnání druhů navzájem však bylo možné pozorovat lehké odlišnosti. U vzorků komplexu *Cx. pipiens* jsem krátké úseky odpovídající flavivirové RNA zaznamenala dokonce dva, na dvou různých pozicích v rámci získaných sekvencí. Vysvětlením těchto pozorování může být schopnost flavivirů integrovat se do genomu svých hostitelů, která byla několikrát prokázána (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Katzourakis *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2014). V různých studiích byla metodou postupného sekvenování genomu komárů prokázána integrace nejen velkých úseků flavivirové genetické informace, ale také krátkých fragmentů, které na sebe navzájem nenavazovaly (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Katzourakis *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2014). U většiny objevených vložených virových segmentů byly nalezeny terminační kodony vylučující vznik funkčních produktů (Crochu *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2014). U komárů druhu *Ae. albopictus* ale byla detekována také mediátorová RNA (mRNA) odpovídající integrovaným virovým sekvencím, čímž bylo prokázáno, že hostitelské buňky možná některé vložené flavivirové geny využívají (Crochu *et al.*, 2004). Je tedy možné, že i v našem případě mRNA různých druhů komárů, která se při použití univerzálních flavivirových primerů amplifikovala, obsahuje úseky odpovídající virovým segmentům vloženým do genomu těchto komárů. Této hypotéze nasvědčuje také to, že úseky flavivirových sekvencí a jejich pozice byly v rámci jednotlivých druhů identické a mezi jednotlivými druhy komárů navzájem se lišily. V rámci své diplomové práce jsem se však těmito vzorky dále nezabývala.

5.2.1 Vyhodnocení detekovaných flavivirových sekvencí

Při porovnávání získaných virových sekvencí se sekvencemi uloženými v genové bance pomocí algoritmu BLAST i mezi sebou navzájem pomocí programu Geneious jsme vyhodnotili, že se nám podařilo zachytit sekvence náležící čtyřem různým druhům flavivirů. Tyto sekvence byly nejpříbuznější sekvencím klasických ISFs, a k této skupině tedy zřejmě náleží. Od sekvencí ISFs zveřejněných v genové bance se však odlišují z více než 20 %.

Od jednotlivých druhů virů se nám podařilo získat jen relativně krátké sekvence (~250 a ~150 bp). Pro získání dalších úseků z genomu jednotlivých flavivirů jsem vyzkoušela také další univerzální flavivirové primery, amplifikace s nimi však nebyla úspěšná. V případě viru

„CxTFV-like“ jsem na amplifikaci použila také primery navrhnuté pro *Culex theileri* flavivirus (Parreira *et al.*, 2012), který se zdá být tomuto námi detekovanému viru nejpříbuznější (viz obrázek č. 10). Díky tomu jsem získala další dvě sekvence o délce ~100 a ~160 nukleotidů, které ale bohužel na původní získanou sekvenci nenavazovaly, a nebylo tak možné je využít pro fylogenetickou analýzu. Pouze jedna z těchto sekvencí se se sekvencemi uloženými v genové bance překrývala ze 100 % a podobnost s virem CxTFV v tomto případě dosahovala 85 %, tedy hodnoty blízké hranici pro uznání nového druhu viru, kterou postulovali Kuno *et al.* (1998). Důvodem, proč se amplifikace s ostatními primery nezdařila, může být odlišnost viru „CxTFV-like“ od viru CxTFV, pro který byly tyto primery navrhnuty.

Fylogenetická analýza čtyř sekvencí získaných z námi odchycených komárů použitím primerů MAMD a CFD2 (Scaramozzino *et al.*, 2001), ke které byly použity odpovídající sekvence ostatních známých ISFs, potvrdila, že námi detekované sekvence jsou od ostatních specificky hmyzích flavivirů vzdáleny, a představují tedy s největší pravděpodobností samostatné druhy (viz obrázek č. 10), které náleží mezi klasické ISFs.

Relativně široké spektrum hostitelských druhů, zahrnující různé rody komárů, jsem zaznamenala zejména u viru „CxTFV-like“, který jsem detekovala ve většině případů u rodu *Culex*, ale také u několika vzorků komárů rodů *Aedes* a *Coquillettidia*. Virus „AeCinFV“ byl detekován především u komárů *Ae. cinereus*, ale také u jednoho vzorku komplexu *Cx. pipiens*. Nálezy jednoho druhu ISFs u rozdílných druhů i rodů hostitelů se podařilo zdokumentovat také u několika jiných specificky hmyzích flavivirů (viz tabulka č. 1), a nízká hostitelská specifická tedy není u této skupiny virů zřejmě ničím neobvyklým. Zajímavostí je nález smíšené flavivirové infekce „CxTFV-like“ a „AeCinFV“ ve dvou vzorcích komplexu *Ae. cantans*. Je však pravděpodobné, že se nejednalo o koinfekci jednoho jedince, ale o umístění dvou (a více) jedinců, kteří byli infikováni různými viry, do jednoho vzorku. Vzhledem k tomu, že v těchto vzorcích byli přítomni jedinci určení pouze na úroveň komplexu, mohlo se jednat také o jedince představující různé druhy komárů. O hostitelské specifické námi detekovaných ISFs proto z těchto smíšených nálezů nelze učinit jednoznačné závěry. Zbývající dva flaviviry jsem detekovala pouze u jednoho („595c“) či dvou („502“) vzorků, a vyvozování závěrů o hostitelské specifické by tedy nebylo relevantní.

Přes výrazné rozdíly v počtu odchycených jedinců se virus „CxTFV-like“ podařilo detekovat u komárů ze dvou navzájem vzdálených lokalit. V jedé z nich (NPR Řežabinec a Řežabinecké tůňě) byl tento virus u druhu *Cx. modestus* navíc zaznamenán v roce 2013 i 2015 (opět i navzdory mnohem menšímu počtu jedinců odchycených v roce 2015), což naznačuje

jeho dlouhodobé přetrvávání v populaci tohoto druhu komárů v dané lokalitě. Také virus „502“ byl detekován u komárů stejného druhu (*Culiseta morsitans*) v NPR Řežabinec a Řežabinecké tůň ve dvou po sobě následujících letech (2013 a 2014). Tento druh komárů nebyl v odchycích příliš zastoupen (celkem bylo odchyceno jen 71 jedinců rozdělených do 11 vzorků), a lze tedy předpokládat, že u tohoto druhu je virem „502“ infikována dostatečně velká část komárů a (hostitelsky specifický) virus se v jejich populaci rovněž udržuje dlouhodobě. K vyhodnocení celkové prevalence námi detekovaných virů, ať už v rámci geografického rozšíření či dlouhodobého výskytu u jednotlivých druhů komárů na jedné lokalitě, by bylo zapotřebí ve výzkumu dále pokračovat.

5.3 Experimentální infekce

5.3.1 Izolace virů na buněčných kulturách C6/36

Buněčná linie C6/36 pocházející z komárů *Ae. albopictus* hrála v objevu specificky hmyzích flavivirů významnou roli. Blitvich *et* Firth (2015) se domnívají, že všechny tzv. klasické ISFs jsou schopné tyto buňky infikovat. Přesto se izolace některých specificky hmyzích flavivirů na těchto buněčných kulturách nepodařila (Pabbaraju *et al.*, 2009; Calzoari *et al.*, 2010a; Calzoari *et al.*, 2012; Hoshino *et al.*, 2012; Roiz *et al.*, 2012; Grisenti *et al.*, 2015).

O izolaci námi detekovaných ISFs jsem se pokusila s několika různými vzorky. K úspěšnému namnožení viru v kulturách buněk C6/36 však došlo pouze po inokulaci jednoho z nich, homogenátu komárů druhu *Cx. modestus*, u kterého jsme detekovali virus „CxTFV-like“. Přítomnost viru pomocí metody PCR se mi podařilo potvrdit až v materiálu odebraném z infikované kultury devatenáctý den po inokulaci, výsledky PCR s dříve odebranými vzorky byly negativní. První experiment se dvěma vzorky, které rovněž obsahovaly RNA viru „CxTFV-like“, jsem kvůli negativním výsledkům PCR ukončila již dvanáctý den po inokulaci. Je proto možné, že i v tomto případě virus buňky nakazil, ale v kultuře ho bylo v počáteční fázi přítomno příliš malé množství, které nebylo možné pomocí PCR detekovat. Doba potřebná k dostatečné replikaci ISFs se mezi různými druhy liší a detekce pomocí PCR byla u jednoho z nich úspěšná dokonce až po čtvrté pasáži viru na kulturách buněk C6/36 (Bolling *et al.*, 2011). Virus „CxTFV-like“ nezpůsobuje na rozdíl od mnoha jiných specificky hmyzích flavivirů na buňky C6/36 cytopatický efekt (CPE), díky kterému by bylo možné rozeznat infikované kultury od neinfikovaných či kvantifikovat množství viru v kultuře. Absence CPE však byla popsána u několika dalších ISFs (Morales-Betoulle *et al.*, 2008;

Farfan-Ale et al., 2009; Hoshino et al., 2009; Machado et al., 2012; Pauvolid-Correa et al., 2014), a nejedná se tak o zcela výjimečné pozorování. Morfologie i velikost (40 – 50 nm) virionů námi izolovaného viru „CxFV-like“, zdokumentovaná pomocí transmisní elektronové mikroskopie, je obdobná jako u ostatních ISFs (např. Cook *et al.*, 2009; Junglen *et al.*, 2009; Huhtamo *et al.*, 2012; Parreira *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2014; Bolling *et al.*, 2015a). Pozorování virových částic v kultuře buněk C6/36 pomocí TEM tedy potvrdilo příslušnost viru „CxFV-like“ k čeledi *Flaviviridae* a navíc představovalo nezpochybnitelný důkaz úspěšné izolace viru.

Izolovat na buněčných kulturách C6/36 jsem se pokoušela také druhý námi detekovaný virus, „AeCinFV“. Přestože jsem experiment opakovala s několika různými homogenáty při dodržení stejného postupu jako u infekce virem „CxFV-like“, inokulace žádného z nich nevedla k namnožení viru, a to ani po sedmi pasážích. Vzhledem k tomu, že buňky linie C6/36 mají omezenou antivirovou odpověď (Brackney *et al.*, 2010), nezdá se příliš pravděpodobné, že by důvodem neúspěšné izolace byla neschopnost tohoto flaviviru buňky infikovat. Lze předpokládat, že příčinou je spíše poškození virových částice přítomných ve vzorcích, jejichž RNA jsem sice detekovala, ale virus už nebyl ve stavu, kdy by byl schopný infekce buněk.

5.3.2 Experimentální infekce komárů z laboratorního chovu

Virem „CxFV-like“, který byl úspěšně izolován na buňkách C6/36, jsem se pokusila infikovat také komáry druhu *Cx. quinquefasciatus* z našeho laboratorního chovu. Navzdory tomu, že jsem vyzkoušela všechny metody experimentálních infekcí komárů, které byly u ISFs popsány (Lutomiah *et al.*, 2007; Kent *et al.*, 2010; Saiyasombat *et al.*, 2011; Goenaga *et al.*, 2015), žádný z pokusů nebyl úspěšný.

U perorální infekce sáním cukerné potravy i krve obsahující „CxFV-like“ virus se mi pomocí metody PCR podařilo potvrdit, že se virus ihned po sání v komárech vyskytoval. Infekčnost materiálu použitého k perorálním nákazám dospělců i larev, stejně jako k intrathorakální injikaci, byla ověřena inokulací do buněčných kultur C6/36, kde virus buňky úspěšně nakazil a replikoval se v nich. Na rozdíl od pokusů popsaných ve výše zmíněných člancích, jsme neměli přesně definováno množství viru, které bylo k jednotlivým experimentům použito. Avšak v dospělých komárech zkoumaných těsně po sání se ho vyskytovalo dostatečné množství na to, aby byl pomocí PCR detekován.

Ačkoliv jsme tedy prokázali, že se infekce schopný virus v detekovatelném množství

do dospělých komárů úspěšně dostal, nebyl v nich zřejmě schopen se udržet ani namnožit. V případě perorálních infekcí dospělců mohla být důvodem nepřírozená cesta nákazy, zejména v případě infekční krve. Přestože úspěšná nákaza komárů sáním krve infikované jedním z ISFs byla popsána (Lutomiah *et al.*, 2007), ISFs jsou z definice viry specifické pro hmyz, které nejsou schopné infikovat obratlovčí buňky. V přirozeném prostředí představuje zdroj cukerné potravy pro komáry především nektar z květů. Sdílení takového zdroje větším množstvím jedinců, kteří by touto cestou na sebe mohli virovou infekci přenést, se také jeví spíše jako nepravděpodobný (i když potencionálně možný) způsob přirozeného koloběhu flavivirů.

K negativním výsledkům vedl i pokus o infekci larev komárů, které se měly nakazit pozřením infikovaných buněk či virionů v médiu, do kterého byly přeneseny. V tomto případě jsem však neověřovala, zda se infekční materiál do larev skutečně dostal, a je tedy možné, že larvy byly málo vyhladovělé a nebyly ochotné po přenesení do kultivační lahve přijímat dostatečné množství potravy. Přirozenou alternativu tohoto způsobu nákazy, která vedla v jenom z popsáných pokusů v laboratorních podmínkách k úspěšné infekci larev (Lutomiah *et al.*, 2007), by mohla představovat typická situace, kdy se larvy živí mimo jiné částmi těl komárů, kteří na líhništích (ve stojaté vodě, kam jsou kladena vajíčka) uhynuli. Intrathorakální injekce samozřejmě také není přirozeným způsobem, jakým by se komáři mohli v přirozeném prostředí nakazit, ale v publikovaných experimentech byl tento způsob infekce vždy úspěšný (Kent *et al.*, 2010; Saiyasombat *et al.*, 2011; Goenaga *et al.*, 2015). V našem případě se však ani injikovaný virus v komárech nenamnožil. Nabízí se vysvětlení, že komáři druhu *Cx. quinquefasciatus* nejsou vhodnými hostiteli viru „CxTFV-like“, který není schopen jejich buňky infikovat, ať už je do nich vpraven jakoukoliv cestou.

6 ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na detekci specificky hmyzích flavivirů (ISFs) u komárů v České republice. Za tímto účelem jsem během let 2013 až 2015 odchytila celkem 9 658 samic komárů na třech různých lokalitách, naprostá většina z nich však pocházela z lokality NPR Řežabinec a Řežabinecké tůně.

Flavivirovou RNA jsem detekovala ve 45 vzorcích obsahujících celkem 443 komářích samiček. Získané sekvence ve všech případech náležely mezi ISFs, čímž se mi podařilo potvrdit výskyt této skupiny virů v České republice. Nejvyšší prevalenci flavivirových infekcí jsem zaznamenala u druhů *Culex modestus*, *Aedes cinereus* a *Culiseta morsitans*, nicméně výsledky mohou být ovlivněny rozdílným zastoupením jednotlivých druhů komárů v odchycích.

Celkem se mi podařilo získat čtyři unikátní sekvence, z nichž žádná neodpovídala dosud popsaným druhům/skupinám virů. Fylogenetická analýza těchto sekvencí potvrdila, že se s největší pravděpodobností jedná o čtyři různé druhy flavivirů, které náleží mezi klasické ISFs.

Sekvence pro účely této práce nazvaná „AeCinFV“ byla detekována u komárů *Aedes cinereus* a u komárů komplexu *Culex pipiens*. Přes celkovou podobnost získaných sekvencí tohoto flaviviru jsme u některých sekvencí pozorovali identické odlišnosti na několika nukleotidových pozicích, a do fylogenetické analýzy jsme proto zahrnuli obě varianty. Další detekovaný flavivirus, „CxTFV-like“, byl nalezen v širokém spektru hostitelských druhů komárů rodu *Aedes*, *Culex* a *Coquillettidia*, nejčastěji však u druhu *Cx. modestus*. Výskyt tohoto viru se podařilo prokázat nejen na dvou od sebe vzdálených lokalitách, ale i v odchycích z různých let, což naznačuje jeho dlouhodobé přetrvávání v komářích populacích. Flavivirus, jehož sekvence je v této práci nazvaná „502“, byl detekován ve dvou vzorcích druhu *Cul. morsitans*, které pocházely z různých sezon odchytů. Sekvence provizorně označená jako „595c“ byla nalezena pouze v jediném vzorku komplexu *Cx. pipiens*. Aby bylo možné relevantně vyhodnotit hostitelskou specifitu těchto virů, bylo by potřeba ve výzkumu pokračovat a zejména u početně méně zastoupených druhů komárů získat větší počet jedinců k analýze. Přesto se podařilo prokázat, že podobně jako některé již popsané ISFs, také viry „CxTFV-like“ a „AeCinFV“ infikují různé druhy, a dokonce i rody, komárů.

Na tkáňových kulturách buněk C6/36 se mi podařilo úspěšně izolovat virus „CxTFV-like“ a díky transmisní elektronové mikroskopii také pořídit snímky, které zachycují jeho morfologii. Přestože jsem se tímto virem pokoušela infikovat laboratorně chované komáry druhu *Cx. quinquefasciatus*, a to několika principiálně odlišnými metodami, pokusy nebyly úspěšné. Zdá se proto, že tito komáři nejsou vhodnými hostiteli viru „CxTFV-like“.

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adams A. P., Travassos da Rosa A. P., Nunes M. R., Xiao S. Y., Tesh R. B., 2013.** Pathogenesis of Modoc virus (*Flaviviridae; Flavivirus*) in persistently infected hamsters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 455 – 460
- Aliota M. T., Jones S. A., Dupuis A. P. II., Ciota A. T., Hubálek Z., Kramer L. D., 2012.** Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis antigenic group. *PloS ONE* 7, e39387
- Aranda C., Sánchez-Seco M. P., Cáceres F., Escosa R., Gálvez J. C., Masià M., Marqués E., Ruíz S., Alba A., Busquets N., Vázquez A., Castellà J., Tenorio A., 2009.** Detection and monitoring of mosquito flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 9, 171 – 178
- Bézier A., Herbinière J., Lanzrein B., Drezen J. M., 2009.** Polydnavirus hidden face: The genes producing virus particles of parasitic wasps. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 194 – 203
- Bézier A., Louis F., Jancek S., Periquet G., Thézé J., Gyapay G., Musset K., Lesobre J., Lenoble P., Dupuy C., Gundersen-Rindal D., Herniou E. A., Drezen J. M., 2013.** Functional endogenous viral elements in the genome of the parasitoid wasp *Cotesia congregata*: insights into the evolutionary dynamics of bracoviruses. *Philosophical transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 368, e20130047
- Blitvich B. J., Lin M., Dorman K. S., Soto V., Hovav E., Tucker B. J., Staley M., Platt K. B., Bartholomay L. C., 2009.** Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex* flavivirus, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *Journal of Medical Entomology* 46, 934 – 341
- Blitvich B. J., Firth A. E., 2015.** Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* 7, 1927 – 1959
- Bolling B. G., Eisen L., Moore Ch. G., Blair C. D., 2011.** Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 169 – 177

- Bolling B. G., Olea-Popelka F. J., Eisen L., Moore Ch. G., Blair C. D., 2012.** Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology* 427, 90 – 97
- Bolling B. G., Vasilakis N., Guzman H., Widen S. G., Wood T. G., Popov V. L., Thangamani S., Tesh R. B., 2015a.** Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92, 422 – 428
- Bolling B. G., Weaver S. C., Tesh R. B., Vasilakis N., 2015b.** Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses* 7, 4911 – 4928
- Brackney D. E., Scott J. C., Sagawa F., Woodward J. E., Miller N. A., Schilkey F. D., Mudge J., Wilusz J., Olson K. E., Blair C. D., Ebel G. D., 2010.** C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e856
- Calisher Ch. H., Gould E. A., 2003.** Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. *Advances in Virus Research* 59, 1 – 19
- Calzoari M., Bonilauri P., Bellini R., Caimi M., Defilippo F., Maioli G., Albieri A., Medici A., Veronesi R., Pilani R., Gelati A., Angelini P., Parco V., Fabbi M., Barbieri I., Lelli D., Lavazza A., Cordioli P., Dottori M., 2010a.** Arboviral survey of mosquitoes in two Northern Italian regions in 2007 and 2008. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 10, 875 – 884
- Calzoari M., Bonilauri P., Bellini R., Albieri A., Defilippo F., Maioli G., Galletti G., Gelati A., Barbieri I., Tamba M., Lelli D., Carra E., Cordioli P., Angelini P., Dottori M., 2010b.** Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PloS ONE* 5, e14324
- Calzoari M., Zé-Zé L., Růžek D., Vázquez A., Jeffries C., Defilippo F., Osório H. C., Kilian P., Ruíz S., Fooks A. R., Maioli G., Amaro F., Tlustý M., Figuerola J., Medlock J. M., Bonilauri P., Alves M. J., Šebesta O., Tenorio A., Vaux A. G. C., Bellini R., Gelbič I., Sánchez-Seco M. P., Johnson N., Dottori M., 2012.** Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *Journal of General Virology* 93, 1215 – 1225

- Calzoari M., Zé-Zé L., Vázquez A., Sánchez Seco M. P., Amaro F., Dottori M., 2015.** Insect- specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infection, Genetics and Evolution* 40, 381 – 388
- Carrera J-P., Guzman H., Beltrán D., Díaz Y, López-Vergès S., Torres-Cosme R., Popov V, Widen S. G., Wood T. G., Weaver S. C., Cáceres-Carrera L., Vasilakis N., Tesh R. B., 2015.** Mercadeo virus: a novel mosquito-specific flavivirus from Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93, 1014 – 1019
- Cerutti F., Giacobini M., Mosca A., Grasso I., Rambozzi L., Rossi L., Bertolotti L., 2012.** Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasites & Vectors* 5, e99
- Constantine D. G., Woodall D. F., 1964.** Latent infection of Rio Bravo virus in salivary glands of bats. *Public Health Reports* 79, 1033 – 1039
- Cook S., Bennett S. N., Holmes E. C, De Chesse R., Moureau G., de Lamballerie X., 2006.** Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *Journal of General Virology* 87, 735 – 748
- Cook S., Moureau G., Harbach R. E., Mukwaya L., Goodger K., Ssenfuka F., Gould E., Holmes E. C., de Lamballerie X., 2009.** Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex* flavivirus (*Flaviviridae*) from a natural mosquito population in Uganda. *Journal of General Virology* 90, 2669 – 2678
- Cook S., Moureau G., Kitchen A., Gould E. A., de Lamballerie X., Holmes E. C., Harbach R. E., 2012.** Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *Journal of General Virology* 93, 223 – 234
- Cook S., Chung B. Y.-W., Bass D., Moureau G., Tang S., McAlister E., Culverwell C. L., Glücksman E., Wang H., Brown T. D. K., Gould E. A., Harbach R. E., de Lamballerie X., Firth A. E., 2013.** Novel virus discovery and genome reconstruction from field RNA samples reveals highly divergent viruses in dipteran hosts. *PloS ONE* 8, e80720
- Cornelis G., Vernochet C., Malicorne S., Souquere S., Tzika A. C., Goodman S. M., Catzeflis F., Robinson T. J., Milinkovitch M. C., Pierron G., Heidmann O., Dupressoir A., Heidmann T., 2014.** Retroviral envelope *syncytin* capture in an ancestrally diverged mammalian clade for placentation in the primitive Afrotherian tenrecs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 4332 – 4341

- Crabtree M. B., Sang R. C., Stollar V., Dunster L. M., Miller B. R., 2003.** Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Archives of Virology* 148, 1095 – 1118
- Crabtree M. B., Nga P. T., Miller B. R., 2009.** Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Archives of Virology* 154, 857 – 860
- Crockett R. K., Burkhalter K., Mead D., Kelly R., Brown J., Varnado W., Roy A., Horiuchi K., Biggerstaff B. J., Miller B., Nasci R., 2012.** *Culex* flavivirus and West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* populations in the southeastern United States. *Journal of Medical Entomology* 49, 165 – 174
- Crochu S., Cook S., Attoui H., Charrel R. N., De Chesse R., Belhouchet M., Lemasson J. J., de Micco P., de Lamballerie X., 2004.** Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *Journal of General Virology* 85, 1971–1980
- Datta S., Gopalakrishnan R., Chatterjee S., Veer V., 2015.** Phylogenetic characterization of a novel insect-specific flavivirus detected in a *Culex* pool, collected from Assam, India. *Intervirology* 58, 149 – 154
- Dunlap K. A., Palmarini M., Varela M., Burghardt R. C., Hayashi K., Farmer J. L., Spencer T. E., 2006.** Endogenous retroviruses regulate periimplantation placental growth and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14390 – 14395
- Dupressoir A., Vernochet C., Bawa O., Harper F., Pierron G., Opolon P., Heidmann T., 2009.** Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12127 – 12132
- Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T., 2012.** From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured *syncytins* in placentation. *Placenta* 33, 663 – 671
- Dupuy C., Periquet G., Serbielle C., Bézier A., Louis F., Drezen J-M., 2011.** Transfer of a chromosomal *Maverick* to endogenous bracovirus in a parasitoid wasp. *Genetica* 139, 489 – 496
- Esnault C., Cornelis G., Heidmann O., Heidmann T., 2013.** Differential evolutionary fate of an ancestral primate endogenous retrovirus envelope gene, the EnvV *Syncytin*, captured for a function in placentation. *PloS Genetics* 9, e1003400

- Espinoza-Gómez F., López-Lemus A. U., Rodríguez-Sánchez I. P., Martínez-Fierro M. L., Newton-Sánchez O. A., Chávez-Flores E., Delgado-Enciso I., 2011.** Detection of sequences from a potentially novel strain of cell fusing agent virus in Mexican *Stegomyia (Aedes) aegypti* mosquitoes. *Archives of Virology* 156, 1263 – 1267
- Evangelista J., Cruz C., Guevara C., Astete H., Carey C., Kochel T. J., Morrison A. C., Williams M., Halsey E. S., Forshey B. M., 2013.** Characterization of a novel flavivirus isolated from *Culex (Melanoconion) ocosa* mosquitoes from Iquitos, Peru. *Journal of General Virology* 94, 1266 – 1272
- Fairbrother A., Yuill T. M., 1987.** Experimental infection and horizontal transmission of Modoc virus in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of Wildlife Diseases* 23, 179 – 185
- Fan H., Zhao Q., Guo X., Sun Q., Zuo S., Wu Ch., Zhou H., An X., Pei G., Tong Y., Zhang J., Shi T., 2016.** Complete genom sequence of Xishuangbanna flavivirus, a novel mosquito-specific flavivirus from China. *Archives of Virology* 161, 1723 – 1727
- Farfan-Ale J. A., Loroño-Pino M. A., Garcia-Rejon J. E., Hovav E., Powers A. M., Lin M., Dorman K. S., Platt K. B., Bartholomay L. C., Soto V., Beaty B. J., Lanciotti R. S., Blitvich B. J., 2009.** Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80, 85 – 89
- Fernandes L. N., de Paula M. B., Araújo A. B., Gonçalves E. F. B., Romano C. M., Natal D., dos Santos Malafronte R., Marrelli M. T., Levi J. E., 2016.** Detection of *Culex* flavivirus and *Aedes* flavivirus nucleotide sequences in mosquitoes from parks in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Tropica* 157, 73 – 83
- Ferreira D. D., Cook S., Lopes A., de Matos A. P., Esteves A., Abecasis A., de Almeida A. P. G., Piedade J., Perreira R., 2013.** Characterization of an insect-specific flavivirus (OCFV_{PT}) co-isolated from *Ochlerotatus caspius* collected in southern Portugal along with a putative new Negev-like virus. *Virus Genes* 47, 532 – 545
- Firth A. E., Blitvich B. J., Wills N. M., Miller C. L., Atkins J. F., 2010.** Evidence for ribosomal frameshifting and a novel overlapping gene in the genomes of insect-specific flaviviruses. *Virology* 399, 153 – 166

- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299
- Gaunt M. W., Gould E. A., 2005.** Rapid subgroup identification of the flaviviruses using degenerate primer E-gene RT-PCR and site specific restriction enzyme analysis. *Journal of Virological Methods* 128, 113 – 127
- Gelbič I., Šebesta O., Růžek D., Kilian P., 2012.** Zpřesnění a standardizace metodiky monitoringu výskytu komárů a postupu pro detekci flavivirů a bunyavirů. Biologické centrum AV ČR v. v. i., Entomologický ústav
- Geuking M. B., Weber J., Dewannieux M., Gorelik E., Heidmann T., Hengartner H., Zinkernagel R. M., Hangartner L., 2009.** Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science* 323, 393 – 396
- Goenaga S., Fabbri C. M., García J. B., Rondán J. C., Gardenal N., Calderón G. E., Enria D. A., Levis S. M. C., 2014.** New strains of *Culex* flavivirus isolated in Argentina. *Journal of Medical Entomology* 51, 900 – 906
- Goenaga S., Kenney J. L., Duggal N. K., Delorey M., Ebel G. D., Zhang B., Levis S. C., Enria D. A., Brault A. C., 2015.** Potential for co-infection of a mosquito-specific flavivirus, Nhumirim virus, to block West Nile virus transmission in mosquitoes. *Viruses* 7, 5801 – 5812
- Grisenti M., Vázquez A., Herrero L., Cuevas L., Perez-Pastrana E., Arnoldi D., Rosà R., Capelli G., Tenorio A., Sánchez-Seco M. P., Rizzoli A., 2015.** Wide detection of *Aedes* flavivirus in north-eastern Italy – a European hotspot of emerging mosquito-borne diseases. *Journal of General Virology* 96, 420 – 430
- Haddow A. D., Guzman H., Popov V. L., Wood T. G., Widen S. G., Haddow A. D., Tesh R. B., Weaver S. C., 2013.** First isolation of *Aedes* flavivirus in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *Virology* 440, 134 – 139
- Herniou E. A., Huguet E., Thézé J., Bézier A., Periquet G., Drezen J-M., 2013.** When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnviruses. *Philosophical transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 368, e20130051

- Hesson J. C., Rettich F., Merdić E., Vignjević G., Östman Ö., Schäfer M., Schaffner F., Foussadier R., Besnard G., Medlock J., Scholte E. J., Lundström J. O., 2014.** The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Medical and Veterinary Entomology* 28, 179 – 186
- Hesson J. C., Ignell R., Hill S. R., Östman Ö., Lundström J. O., 2015.** Trapping biases of *Culex torrentium* and *Culex pipiens* revealed by comparison of captures in CDC traps, ovitraps, and gravid traps. *Journal of Vector Ecology* 40, 158 – 163
- Hobson-Peters J., Yam A. W. Y., Lu J. W. F., Setoh Y. X., May F. J., Kurucz N., Walsh S., Prow N. A., Davis S. S., Weir R., Melville L., Hunt N., Webb R. I., Blitvich B. J., Whelan P., Hall R. A., 2013.** A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. *PloS ONE* 8, e56534
- Horie M., Honda T., Suzuki Y., Kobayashi Y., Daito T., Oshida T., Ikuta K., Jern P., Gojobori T., Coffin J. M., Tomonaga K., 2010.** Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463, 84 – 87
- Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M., Sawabe K., 2007.** Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359, 405 – 414
- Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Sawabe K., Kobayashi M., 2009.** Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes f. lavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 391, 119 – 129
- Hoshino K., Takahashi-Nakaguchi A., Isawa H., Sasaki T., Higa Y., Kasai S., Tsuda Y., Sawabe K., Kobayashi M., 2012.** Entomological surveillance for flaviviruses at migratory bird stopover sites in Hokkaido, Japan, and a new insect flavivirus detected in *Aedes galloisi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 49, 175 – 182
- Huang Y. J. S., Higgs S., McElroy Horne K., Vanlandingham D. L., 2014.** Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses* 6, 4703 – 4730
- Huanyu W., Haiyan W., Shihong F., Guifang L., Hong L., Xiaoyan G., Lizhi S., Rayner S., Aiqiang X., Guodong L., 2012.** Isolation and identification of a distinct strain of *Culex* flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China. *Virology Journal* 9, e73

- Huhtamo E., Putkuri N., Kurkela S., Manni T., Vaheri A., Vapalahti O., Uzcátegui N. Y., 2009.** Characterization of a novel flavivirus from mosquitoes in northern Europe that is related to mosquito-borne flaviviruses of the tropics. *Journal of Virology* 83, 9532 – 9540
- Huhtamo E., Moureau G., Cook S., Julkunen O., Putkuri N., Kurkela S., Uzcátegui N. Y., Harbach R. E., Gould E. A., Vapalahti O., de Lamballerie X., 2012.** Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe. *Virology* 433, 471 – 478
- Huhtamo E., Cook S., Moureau G., Uzcátegui N. Y., Sironen T., Kuivanen S., Putkuri N., Kurkela S., Harbach R. E., Firth A. E., Vapalahti O., Gould E. A., de Lamballerie X., 2014.** Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses. *Virology* 464-465, 320 – 329
- Hunter S. J., Goodall T. I., Walsh K. A., Owen R., Day J. C., 2008.** Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects. *Molecular Ecology Resources* 8, 56 – 61
- Chen Y. Y., Lin J. W., Fan Y. C., Tu W. C., Chang G. J., Chiou S. S., 2013.** First detection of the Africa/Caribbean/Latin American subtype of *Culex* flavivirus in Asian country, Taiwan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 36, 387 – 396
- Chhilar J. S., Chaudhry S., 2010.** First report of a biting midge *Culicoides anophelis* parasitizing mosquito *Anopheles stephensi* from North-Western India. *Journal of Experimental Sciences* 1, 3 – 6
- Chiba S., Kondo H., Tani A., Saisho D., Sakamoto W., Kanematsu S., Suzuki N., 2011.** Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PloS Pathogens* 7, e1002146
- Jancek S., Bézier A., Gayral P., Paillusson C., Kaiser L., Dupas S., Le Ru B. P., Barbe V., Periquet G., Drezen J-M., Herniou E. A., 2013.** Adaptive selection on bracovirus genomes drives the specialization of *Cotesia* parasitoid wasps. *PloS ONE* 8, e64432
- Junglen S., Kopp A., Kurth A., Pauli G., Ellerbrok H., Leendertz F. H., 2009.** Flavivirus isolated from *Uranotaenia* mosquitoes from a tropical rain forest. *Journal of Virology* 83, 4462 – 4468
- Katzourakis A., Gifford R. J., 2010.** Endogenous viral elements in animal genomes. *PloS Genetics* 6, e1001191

- Kenney J. L., Solberg O. D., Langevin S. A., Brault A. C., 2014.** Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. *Journal of General Virology* 95, 2796 – 2808
- Kent R. J., Crabtree M. B., Miller B. R., 2010.** Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* Say infected with Culex flavivirus Izabal. *PloS Neglected Tropical Diseases* 4, e671
- Kihara Y., Satho T., Eshita Y., Sakai K., Kotaki A., Takasaki T., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Srisawat R., Lapcharoen P., Sumroiphon S., Iwanaga S., Ushijima H., Endoh D., Miyata T., Sakata A., Kashige N., Miake F., Fukushi S., Saijo M., Kurane I., Morikawa S., Mizutani T., 2007.** Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *Journal of Virological Methods* 146, 372 – 374
- Kim D. Y., Guzman H., Bueno R. Jr., Dennett J. A., Auguste A. J., Carrington Ch. V. F., Popov V. L., Weaver S. C., Beasley D. W. C., Tesh R., B., 2009.** Characterization of Culex Flavivirus (*Flaviviridae*) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology* 386, 154 – 159
- Kolodziejek J., Pachler K., Bin H., Mendelson E., Shulman L., Orshan L., Nowotny N., 2013.** Barkedji virus, a novel mosquito-borne flavivirus identified in *Culex perexiguus* mosquitoes, Israel, 2011. *Journal of General Virology* 94, 2449 – 2457
- Kramář J., 1958.** Fauna ČSR Komáři Bodaví – *Culicinae*. Nakladatelství Československé Akademie věd Praha
- Kuno G., Chang G. J. J., Tsuchiya K. R., Karabatsos N., Cropp C. B., 1998.** Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72, 73 – 83
- Kuwata R., Sugiyama H., Yonemitsu K., Van Dung N., Terada Y., Taniguchi M., Shimoda H., Takano A., Maeda K., 2015a.** Isolation of Japanese encephalitis virus and a novel insect-specific flavivirus from mosquitoes collected in a cowshed in Japan. *Archives of Virology* 160, 2151 – 2159
- Kuwata R., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Maeda K., Sawabe K., 2015b.** Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with Culex flavivirus (*Flaviviridae*). *Journal of Medical Entomology* 52, 222 – 229

- Laird M., 1946.** A ceratopogonine midge (*Culicoides anophelis* Edwards, 1922) sucking engorged blood from a mosquito (*Armigeres lacuum* Edwards, 1922) at Palmal, New Britain. Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand 76, 158–161.
- Lee Y. M., Tscherne D. M., Yun S-I., Frolov I., Rice Ch. M., 2005.** Dual mechanism of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. Journal of Virology 79, 3231 – 3242
- Lee J. S., Grubaugh N. D., Kondig J. P., Turell M. J., Kim H. Ch., Klein T. A., O’Guinn M. L., 2013.** Isolation and genomic characterization of Chaoyang virus strain ROK144 from *Aedes vexans nipponii* from the Republic of Korea. Virology 435, 220 – 224
- Liang W., He X., Liu G., Zhang S., Fu S., Wang M., Chen W., He Y., Tao X., Jiang H., Lin X., Gao X., Hu W., Liu Y., Feng L., Cao Y., Yang G., Jing Ch., Liang G., Wang H., 2015.** Distribution and phylogenetic analysis of Culex flavivirus in mosquitoes in China. Archives of Virology 160, 2259 – 2268
- Liu H., Gao X., Liang G., 2011.** Newly recognized mosquito-associated viruses in mainland China, in the last two decades. Virology Journal 8, e68
- Lobo F. P., Mota B. E. F., Pena S. D. J., Azevedo V., Macedo A. M., Tauch A., Machado C. R., Franco G. R., 2009.** Virus-host coevolution: Common patterns of nucleotide motif usage in *Flaviviridae* and their hosts. PLoS ONE 4, e6282
- Lühken R., Pfitzner W. P., Börstler J., Garms R., Huber K., Schork N., Steinke S., Kiel E., Becker N., Tannich E., Krüger A., 2014.** Field evaluation of four widely used mosquito traps in Central Europe. Parasites & Vectors 7, e268
- Lutomiah J. J. L., Mwandawiro Ch., Magambo J., Sang R. C., 2007.** Infection and vertical transmission of Kamiti river virus in laboratory bred *Aedes aegypti* mosquitoes. Journal of Insect Science 7, e55
- Machado D. C., Mondini A., dos Santos Santana V., Yonamine P. T. K., Chiaravalloti Neto F., Zanotto P. M., Nogueira M. L., 2012.** First identification of Culex flavivirus (*Flaviviridae*) in Brazil. Intervirology 55, 475 – 483
- Maori E., Tanne E., Sela I., 2007.** Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. Virology 362, 342 – 349

- McLean B. J., Hobson-Peters J., Webb C. E., Watterson D., Prow N. A., Nguyen H. D., Hall-Mendelin S., Warrilow D., Johansen Ch. A., Jansen C. C., van den Hurk A. F., Beebe N. W., Schnettler E., Barnard R. T., Hall R. A., 2015.** A novel insect-specific flavivirus replicates only in *Aedes*-derived cells and persist at high prevalence in wild *Aedes vigilax* populations in Sydney, Australia. *Virology* 486, 272 – 283
- Mellor P. S., 2000.** Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology* 123, 231 – 247
- Misencik M. J., Grubaugh N. D., Andreadis T. G., Ebel G. D., Armstrong P. M., 2016.** Isolation of a novel insect-specific flavivirus from *Culiseta melanura* in the northeastern United States. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 16, 181 – 190
- Morales-Betoulle M. E., Monzón Pineda M. L., Sosa S. M., Panella N., López M. R., Córdón-Rosales C., Komar N., Powers A., Johnson B. W., 2008.** *Culex* flavivirus isolates from mosquitoes in Guatemala. *Journal of Medical Entomology* 45, 1187 – 1190
- Moureau G., Temmam S., Gonzales J. P., Charrel R. N., Grard G., de Lamballerie X., 2007.** A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7, 467 – 477
- Moureau G., Ninove L., Izri A., Cook S., de Lamballerie X., Charrel R. N., 2010.** Flavivirus RNA in Phlebotomine sandflies. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10, 195 – 197
- Moureau G., Cook S., Lemey P., Nougairede A., Forrester N. L., Khasnatinov M., Charrel R. N., Firth A. E., Gould E. A., de Lamballerie X., 2015.** New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. *PloS ONE* 10, e0117849
- Newman Ch. M., Cerutti F., Anderson T. K., Hamer G. L., Walker E. D., Kitron U. D., Ruiz M. O., Brawn J. D., Goldberg T. L., 2011.** *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 1099 – 1105
- Newman Ch. M., Anderson T. K., Goldberg T. L., 2016.** Decreased flight activity in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) naturally infected with *Culex* flavivirus. *Journal of Medical Entomology* 53, 233 – 236

- Ochieng C., Lutomiah J., Makio A., Koka H., Chepkorir E., Yalwala S., Mutisya J., Musila L., Khamadi S., Richardson J., Bast J., Schnabel D., Wurapa E., Sang R., 2013.** Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 – 2012. *Virology Journal* 10, e140
- Osório H. C., Zé-Zé L., Amaro F., Alves M. J., 2014.** Mosquito surveillance for prevention and control of emerging mosquito-borne diseases in Portugal – 2008-2014. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 11583 – 11596
- Pabbaraju K., Ho K. C. Y., Wong S., Fox J. D., Kaplen B., Tyler S., Drebot M., Tilley P. A. G., 2009.** Surveillance of mosquito-borne viruses in Alberta using reverse transcription polymerase chain reaction with generic primers. *Journal of Medical Entomology* 46, 640 – 648
- Papa A., Papadopoulou E., Kalaitzopoulou S., Tsioka K., Mourelatos S., 2014.** Detection of West Nile virus and insect-specific flavivirus RNA in *Culex* mosquitoes, central Macedonia, Greece. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108, 555 – 559
- Papa A., Papadopoulou E., Paliwal R., Kalaitzopoulou S., Mourelatos S., Niedrig M., 2016.** Insect-specific flaviviruses in *Aedes* mosquitoes in Greece. *Archives of Virology* 161, 2183 – 2188
- Parreira R., Cook S., Lopes A., de Matos A. P., de Almeida A. P. G., Piedade J., Esteves A., 2012.** Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Research* 167, 152 – 161
- Pautasso A., Desiato R., Bertolini S., Vitale N., Radaelli M. C., Mancini M., Rizzo F., Mosca A., Calzoari M., Prearo M., Mandola M. L., Maurella C., Mignone W., Chiavacci L., Casalone C., 2013.** Mosquito surveillance in Northwestern Italy to monitor the occurrence of tropical vector-borne diseases. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 154 – 161
- Pauvolid-Corrêa A., Solberg O., Couto-Lima D., Kenney J., Serra-Freire N., Brault A., Nogueira R., Langevin S., Komar N., 2014.** Nhimirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Archives of Virology* 160, 21 – 27

- Pichon A., Bézier A., Urbach S., Aury J-M., Jouan V., Ravallec M., Guy J., Cousserans F., Thézé J., Gauthier J., Demettre E., Schmieder S., Wurmser F., Sibut V., Poirié M., Colinet D., da Silva C., Couloux A., Barbe V., Drezen J-M., Volkoff A. N., 2015.** Recurrent DNA virus domestication leading to different parasite virulence strategies. *Science Advances* 1, e1501150
- Pukhovskaya N. M., Vysochina N. P., Bakhmetyeva S. V., Zdanovskaya N. I., Belozerova N. B., Ivanov L. I., Morozova O. V., 2016.** Detection of the insect-specific flavivirus Chaoyang in mosquitoes in the Jewish Autonomous region of the Far East of Russia. *Journal of Neuroinfectious Diseases* 7, 205
- Rádrová J., 2008.** Výskyt a rozšíření přenašečů viru Západonilské horečky v České republice. Diplomová práce PřF UK, Katedra parazitologie
- Ravanini P., Huhtamo E., Ilaria V., Crobu M. G., Nicosia A. M., Servino L., Rivasi F., Allegrini S., Miglio U., Magri A., Minisini R., Vapalahti O., Boldorini R., 2012.** Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro Surveillance* 17, e20221
- Rizzo F., Cerutti F., Ballardini M., Mosca A., Vitale N., Radaelli M. C., Desiato R., Prearo M., Pautasso A., Casalone C., Acutis P., Peletto S., Mandola M. L., 2014.** Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy 2011 – 2012. *Parasites & Vectors* 7, e395
- Roiz D., Vázquez A., Sánchez Seco M. P., Tenorio A., Rizzoli A., 2009.** Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virology Journal* 6, e93
- Roiz D., Vázquez A., Rosso F., Arnoldi D., Girardi M., Cuevas L., Perez-Pastrana E., Sánchez-Seco M. P., Tenorio A., Rizzoli A., 2012.** Detection of a new insect flavivirus and isolation of Aedes flavivirus in Northern Italy. *Parasites & Vectors* 5, e223
- Root-Bernstein R. S., Hobbs S. H., 1993.** Does HIV „piggyback“ on CD4-like surface proteins of sperm, viruses, and bacteria? Implications for co-transmission, cellular tropism and the induction of autoimmunity in AIDS. *Journal of Theoretical Biology* 160, 249 – 264
- Saiyasombat R., Dorman K. S., Garcia-Rejon J. E., Loroño-Pino M. A., Farfan-Ale J. A., Blitvich B. J., 2010.** Isolation and sequence analysis of Culex flavivirus from *Culex interrogator* and *Culex quinquefasciatus* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Archives of Virology* 155, 983 – 986

- Saiyasombat R., Bolling B. G., Brault A. C., Bartholomay L. C., Blitvich B. J., 2011.** Evidence of efficient transovarial transmission of *Culex* flavivirus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 48, 1031 – 1038
- Sang R. C., Gichogo A., Gachoya J., Dunster M. D., Ofula V., Hunt A. R., Crabtree M. B., Miller B. R., Dunster L. M., 2003.** Isolation of a new flavivirus related to Cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Archives of Virology* 148, 1085 – 1093
- Sánchez-Seco M. P., Vázquez A., Collao X., Hernández L., Aranda C., Ruiz S., Escosa R., Marqués E., Bustillo M. A., Molero F., Tenorio A., 2010.** Surveillance of arboviruses in Spanish wetlands: detection of new flavi- and phleboviruses. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 10, 203 – 206
- Scaramozzino N., Crance J. M., Jouan A., DeBriel D., Stoll F., Garin D., 2001.** Comparison of *Flavivirus* universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical microbiology* 39, 1922 – 1927
- Smith J. L., Fonseca D. M., 2004.** Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 339 – 345
- Stollar V., Thomas V. L., 1975.** An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* 64, 366 – 377
- Takhampunya R., Kim H. Ch., Tippayachai B., Lee D. K., Lee W. J., Chong S. T., Kim M. S., Lee J. S., Klein T. A., 2014.** Distribution and mosquito hosts of Chaoyang virus, a newly reported flavivirus from the Republic of Korea, 2008-2011. *Journal of Medical Entomology* 51, 464 – 474
- Taylor D. J., Bruenn J., 2009.** The evolution of novel fungal genes from non-retroviral RNA viruses. *BMC Biology* 7, e88
- Taylor D. J., Leach R. W., Bruenn J., 2010.** Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evolutionary Biology* 10, e193
- Thézé J., Bézier A., Periquet G., Drezen J-M., Herniou E. A., 2011.** Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15931 – 15935

- Tyler S., Bolling B. G., Blair C. D., Brault A. C., Pabbaraju K., Armijos V., Clark D. C., Calisher Ch. H., Drebot M. A., 2011.** Distribution and phylogenetic comparisons of a novel mosquito flavivirus sequence present in *Culex tarsalis* mosquitoes from western Canada with viruses isolated in California and Colorado. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 162 – 168
- Vasilakis N., Forrester N. L., Palacios G., Nasar F., Savji N., Rossi S. L., Guzman H., Wood T. G., Popov V., Gorchakov R., Vázquez Gonzáles A., Haddow A. D., Watts D. M., Travassos da Rosa A. P. A., Weaver S. C., Lipkin W. I., Tesh R. B., 2013.** Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *Journal of Virology* 87, 2475 – 2488
- Vasilakis N., Tesh R. B., 2015.** Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Current Opinion in Virology* 15, 69 – 74
- Vázquez A., Sánchez-Seco M. P., Palacios G., Molero F., Reyes N., Ruiz S., Aranda C., Marqués E., Escosa N., Moreno J., Figuerola J., Tenorio A., 2012.** Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 12, 223 – 229
- Votýpka J., Šeblová V., Rádrová J., 2008.** Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *Journal of Vector Ecology* 33, 269 – 277
- Walker T., Jeffries C. L., Mansfield K. L., Johnson N., 2014.** Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasites & Vectors* 7, e382
- Werblow A., Flechl E., Klimpel S., Zittra C., Lebl K., Kieser K., Laciny A., Silbermayr K., Melaun C., Führer H. P., 2016.** Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time- and cost-effective technique of mosquito barcoding. *Medical and Veterinary Entomology* 30, 8 – 13
- Zittra C., Flechl E., Kothmayer M., Vitecek S., Rossiter H., Zechmeister T., Führer H. P., 2016.** Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. *Parasites & Vectors* 9, e197
- Zou G., Zhang B., Lim P. Y., Yuan Z., Bernard K. A., Shi P. Y., 2009.** Exclusion of West Nile virus superinfection through RNA replication. *Journal of Virology* 83, 11765 – 11776
- Zuo S., Zhao Q., Guo X., Zhou H., Cao W., Zhang J., 2014.** Detection of Quang Binh virus from mosquitoes in China. *Virus Research* 180, 31 – 38

Sekundární citace:

Drynov I. D., Uryvaev L. V., Nosikov V. V., Zhdanov V. M., 1981. Integration of the genomes of the tick-borne encephalitis virus and of the cell in chronic infection due to this virus and SV40. Dokl Akad Nauk SSSR 258, 1000-1002 (v ruštině)
(z článku Roiz *et al.*, 2009)